



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

(21) BR 112020021037-4 A2



(22) Data do Depósito: 25/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 19/01/2021

(54) **Título:** COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO SÓLIDA, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA PRESERVAR UMA FORMULAÇÃO DE NANO OU MICROPARTÍCULA DE UM AGENTE TERAPEUTICAMENTE ATIVO, USO DE UM COMPOSTO SELECIONADO DE ALCANOS C3-C5 SUBSTITUÍDOS COM UM OU DOIS GRUPOS HIDRÓXI, E, DISPOSITIVO

(51) **Int. Cl.:** A61K 47/10; A61K 48/00; A61K 9/51; A61K 47/59; A61K 47/69; (...).

(30) **Prioridade Unionista:** 14/08/2018 EP 18189010.4; 25/04/2018 EP 18169325.0.

(71) **Depositante(es):** ETHRIS GMBH.

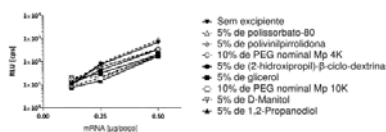
(72) **Inventor(es):** CHRISTIAN DOHMEN; PHILIPP BECK.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2019060646 de 25/04/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/207061 de 31/10/2019

(85) **Data da Fase Nacional:** 14/10/2020

(57) **Resumo:** É provida uma composição compreendendo (i) uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e (ii) pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C3-C5 substituídos com um ou dois grupos hidróxi que estabiliza a formulação de partícula. Aspectos adicionais se referem a uma composição sólida que pode ser obtida congelando a composição estabilizada, e a processos para a preparação das composições de acordo com a invenção.



COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO SÓLIDA, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA PRESERVAR UMA FORMULAÇÃO DE NANO OU MICROPARTÍCULA DE UM AGENTE TERAPEUTICAMENTE ATIVO, USO DE UM COMPOSTO SELECIONADO DE ALCANOS C3-C5 SUBSTITUÍDOS COM UM OU DOIS GRUPOS HIDRÓXI, E, DISPOSITIVO

[001] A presente invenção se refere à estabilização de composições que compreendem uma formulação de partícula de um agente terapeuticamente ativo, em particular uma formulação compreendendo nanopartículas ou micropartículas.

[002] Formulações de nanopartícula e micropartícula são conhecidas por sua capacidade de permitir que agentes terapeuticamente ativos entrem no corpo por aplicação ao ou por meio do trato respiratório. Entretanto, muitos agentes ativos formulados como nano ou micropartículas apresentam estabilidade limitada à temperatura ambiente, e mesmo em um estado refrigerado (por exemplo, a 2-8°C). Uma formulação congelada melhoraria significativamente a estabilidade a longo prazo e assim a aplicabilidade de agentes terapeuticamente ativos formulados como nano ou micropartículas. Entretanto, congelamento em geral leva a processos de agregação que são acompanhados por uma perda de função. Embora a adição de aditivos crioprotetores convencionais previna agregação de partícula durante o congelamento (por exemplo, W. Abdelwahed *et al.*, Adv. Drug Del. Rev. 58 (2006), 1688-1713; J.C. Kasper *et al.*, J. Contr. Rel. 151 (2011), 246-255), permanecem problemas em que a formulação resultante não é funcional após a aplicação pulmonar. Assim, a estabilização de nano ou micropartículas durante o congelamento mantendo ao mesmo tempo sua funcionalidade para aplicação ao ou por meio do trato respiratório pode não ser obtida de forma confiável com crioprotetores padrões, tais como açúcares.

[003] No contexto da presente invenção, uma classe de aditivos foi

identificada que permite inesperadamente congelamento de formulações de nano ou micropartícula mantendo ao mesmo tempo sua funcionalidade durante aplicação ao ou por meio do trato respiratório. Composições combinando as formulações de partícula com tais aditivos crioprotetores permitem que as formulações sejam convenientemente armazenadas e/ou transportadas em um estado sólido congelado antes de sua aplicação.

[004] Assim, a presente invenção provê, de acordo com um primeiro aspecto, uma composição compreendendo

(i) uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e

(ii) pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C_3 - C_5 substituídos com um ou dois grupos hidróxi.

[005] De acordo com um segundo aspecto, a invenção provê uma composição sólida compreendendo:

(i) uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo, e

(ii) pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C_3 - C_5 substituídos com um ou dois grupos hidróxi,

que é obtenível congelando a composição de acordo com o primeiro aspecto.

[006] A seguir neste documento, a composição de acordo com o primeiro aspecto pode também ser referida como a “composição em suspensão”, e a composição de acordo com o segundo aspecto como a “composição sólida”.

[007] Um aspecto adicional da invenção se refere a um processo para a preparação de uma composição de acordo com o primeiro aspecto anterior, o dito processo compreendendo:

a) prover uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e

b) adicionar pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi à fase líquida, em que a adição do aditivo crioprotetor à fase líquida pode ser realizada antes, durante ou após prover a formulação de nano ou micropartícula suspensa na fase líquida.

[008] Similarmente, a invenção provê, de acordo com um aspecto adicional, um processo para a preparação da composição sólida de acordo com o segundo aspecto anterior, o dito processo compreendendo:

uma primeira etapa de preparar uma composição de acordo com o primeiro aspecto anterior por um processo compreendendo

a) prover uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e

b) adicionar pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi à fase líquida, em que a adição do aditivo crioprotetor à fase líquida pode ser realizada antes, durante ou após prover a formulação de nano ou micropartícula suspensa na fase líquida,

e uma segunda etapa de congelar a composição obtida na primeira etapa.

[009] Um aspecto adicional da invenção se refere a um método para preservar uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo, o dito método compreendendo prover uma composição em suspensão de acordo com o primeiro aspecto anterior, e congelar a composição. Ainda um aspecto adicional se refere ao uso de um composto selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi como um aditivo crioprotetor para uma composição compreendendo uma formulação nano ou microparticulada de um agente terapeuticamente ativo.

[0010] Ainda um aspecto adicional da invenção provê um dispositivo

para formar um aerossol a partir de uma composição de particulado suspensa em um líquido ou para nebulizar uma composição como essa, cujo dispositivo compreende a composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção. Um aspecto relacionado provê a composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção para uso no tratamento ou prevenção de uma doença, em que a composição deve ser administrada ao ou por meio do trato respiratório.

[0011] A seguir neste documento, será provida uma descrição detalhada da invenção e de seus aspectos discutidos anteriormente. Será percebido nesse contexto que esses aspectos estão estritamente inter-relacionados. Assim, deve-se entender que a informação detalhada que é provida em relação aos recursos de um aspecto se aplicará também para outros aspectos que se baseiam nesses recursos, a menos que indicado de outra forma.

Agente terapeuticamente ativo

[0012] As composições de acordo com a invenção compreendem uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo. Uma variedade de agentes terapeuticamente ativos é conhecida como sendo adequada para tais formulações de partícula. Nesse contexto, a referência a uma atividade terapêutica inclui agentes que são administrados a um paciente para tratar uma doença ou distúrbio, bem como agentes que são administrados para impedir que uma doença ou distúrbio afete um paciente.

[0013] Um agente terapeuticamente ativo que é preferido para uso no contexto da presente invenção é um ácido nucleico. Dentre ácidos nucleicos como agentes terapeuticamente ativos compreendidos nas formulações de nano ou micropartícula, preferência adicional é dada a RNA, mais preferivelmente RNA de fita única, e o mais preferido é mRNA, incluindo mRNA modificado.

[0014] A expressão "ácido nucleico" engloba todas as formas de tipos de ocorrência natural de ácidos nucleicos, bem como ácidos nucleicos

quimicamente e/ou enzimaticamente sintetizados e também engloba análogos de ácido nucleico e derivados de ácido nucleico tais como, por exemplo, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos peptídicos (PNA), tiofosfatos oligonucleosídeos e fosfotriésteres, oligonucleotídeos morfólicos, oligonucleotídeos catiônicos (US6017700 A, WO/2007/069092), ribo-oligonucleotídeos ou fosforotioatos substituídos. Além disso, a expressão "ácido nucleico" também se refere a qualquer molécula que compreende nucleotídeos ou análogos de nucleotídeo. Não existem limitações com relação à sequência ou tamanho de um ácido nucleico compreendidos na composição da presente invenção. O ácido nucleico é predominantemente definido pelo efeito biológico que deve ser obtido no alvo biológico no qual a composição da presente invenção é distribuída. Por exemplo, no caso de uma aplicação em terapia genética ou de ácido nucleico, o ácido nucleico ou sequência de ácidos nucleicos pode ser definido pelo gene ou fragmento do gene que deve ser expresso ou pela substituição ou reparo pretendido de um gene defeituoso ou qualquer sequência de gene alvo ou pela sequência alvo de um gene a ser inibido, nocauteado ou infra-regulado.

[0015] A expressão "ácido nucleico" engloba oligonucleotídeos ou polinucleotídeos, incluindo ácido deoxi-ribonucleico (DNA) e ácido ribonucleico (RNA). Quanto ao RNA, em princípio qualquer tipo de RNA pode ser empregado no contexto da presente invenção. Em uma modalidade preferida, o RNA é um RNA de fita única. A expressão "RNA de fita única" significa uma única cadeia consecutiva de ribonucleotídeos ao contrário de moléculas de RNA nas quais duas ou mais cadeias separadas formam uma molécula de fita dupla devido a hibridização das cadeias separadas. A expressão "RNA de fita única" não exclui que a molécula de fita única forme em si estruturas de fita dupla tais como laços, estruturas secundária ou terciária.

[0016] O termo "RNA" cobre RNA que codifica para uma sequência

de aminoácidos bem como RNA que não codifica para uma sequência de aminoácidos. Sugeriu-se que mais que 80 % do genoma contém elementos de DNA funcionais que não codificam para proteínas. Essas sequências não codificante incluem elementos de DNA regulador (sítios de ligação para fatores, reguladores e co-reguladores de transcrição, etc.) e sequências que codificam para transcritos que nunca são traduzidos em proteínas. Esses transcritos, que são codificados pelo genoma e transcritos em RNA mas não foram traduzidos em proteínas, são chamados RNAs não codificante (ncRNAs). Assim, em uma modalidade, o RNA é um RNA não codificante. Preferivelmente, o RNA não codificante é uma molécula de fita única. Estudos demonstram que ncRNAs são acionadores críticos em regulação genética, manutenção de integridade genômica, diferenciação celular, e desenvolvimento, e eles são mal regulados em várias doenças humanas. Existem diferentes tipos de ncRNAs: curto (20 a 50 nt), médio (50 a 200 nt), e longo (>200 nt) ncRNAs. ncRNA curto inclui microRNA (miRNA), RNA interferente pequeno (siRNA), RNA que interage com piwi (piRNA), e RNA de iniciação de transcrição (tiRNA). Exemplos de ncRNAs médios são RNAs nucleares pequenos (snRNAs), RNAs nucleolares pequenos (snoRNAs), RNAs de transferência (tRNAs), RNAs associados ao sítio de início de transcrição (TSSaRNAs), RNAs pequenos associados ao promotor (PASRs), e transcritos à montante do promotor (PROMPTs). RNAs não codificante longos (lncRNA) incluem RNA não codificante intergenético longo (lincRNA), lncRNA antissentido, lncRNA intrônico, RNAs de transcritos ultraconservados (T-UCRs), e outros (Bhan A, Mandal SS, ChemMedChem. 2014 Mar 26. doi: 10.1002/cmdc.201300534). Dos RNAs não codificantes supramencionados, apenas siRNA é de fita dupla. Assim, uma vez que em uma modalidade preferida, o RNA não codificante é de fita única, prefere-se que o RNA não codificante não seja siRNA. Em uma outra modalidade, o RNA é um RNA codificante, isto é, um RNA que codifica para uma

sequência de aminoácidos. Tais moléculas de RNA são também referidas como mRNA (RNA mensageiro) e são moléculas de RNA de fita única. Os ácidos nucleicos podem ser produzidos por metodologia química sintética e enzimática conhecida por um versado na técnica, ou pelo uso de tecnologia recombinante, ou podem ser isolados de fontes naturais, ou por uma combinação dos mesmos. Os oligo ou polinucleotídeos podem opcionalmente compreender nucleotídeos não naturais e podem ser de fita única ou dupla ou tripla. “Ácido nucleico” também se referem a oligo ou polinucleotídeos sentido e antissentido, ou seja, uma sequência de nucleotídeos que é complementar a uma sequência de nucleotídeos específica em um DNA e/ou RNA.

[0017] Preferivelmente, a expressão ácido nucleico no contexto da presente invenção se refere a RNA, mais preferivelmente a RNA de fita única, e o mais preferivelmente a mRNA. Deve-se entender que, a menos que indicado de outra forma em um contexto específico, o termo mRNA como usado aqui, engloba mRNA modificado. Em outras palavras, as nano ou micropartículas usadas no contexto da presente invenção preferivelmente compreendem um ácido nucleico como um agente terapeuticamente ativo, e o ácido nucleico é preferivelmente RNA, mais preferivelmente RNA de fita única, e o mais preferivelmente mRNA, cujo mRNA pode ser mRNA modificado.

[0018] RNAs mensageiros (mRNA) são copolímeros que são constituídos de blocos de construção de fosfato de nucleosídeo principalmente com adenosina, citidina, uridina e guanosina como nucleosídeos, que como carreadores intermediários levam a informação genética do DNA no núcleo da célula para o citoplasma, onde ele é traduzido em proteínas. Eles são assim adequados como alternativas para expressão genética.

[0019] No contexto da presente invenção, mRNA deve ser entendido de forma a significar qualquer molécula de poli-ribonucleotídeo que, se entrar

na célula, é adequada para a expressão de uma proteína ou fragmento da mesma ou é traduzível em uma proteína ou fragmento da mesma. O termo “proteína” aqui engloba qualquer espécie de sequência de aminoácidos, isto é, cadeias de dois ou mais aminoácidos que são cada qual ligados por meio de ligações de peptídeo e também inclui peptídeos e proteínas de fusão.

[0020] O mRNA contém uma sequência de ribonucleotídeos que codifica uma proteína ou fragmento da mesma, cuja função na célula ou na vizinhança da célula é necessária ou benéfica, por exemplo, uma proteína cuja falta ou forma deficiente é um desencadeador para uma doença ou uma enfermidade, a provisão de que pode moderar ou prevenir uma doença ou uma enfermidade, ou uma proteína que pode promover um processo que é benéfico para o corpo, em uma célula ou suas vizinhanças. O mRNA pode conter a sequência para a proteína completa ou uma variante funcional da mesma. Adicionalmente, a sequência de ribonucleotídeos pode codificar uma proteína que idade como um fator, indutor, regulador, estimulador ou enzima, ou um fragmento funcional dos mesmos, onde essa proteína é uma, cuja função é necessária a fim de remediar um distúrbio, em particular um distúrbio metabólico ou a fim de iniciar processos *in vivo* tal como a formação de novos vasos sanguíneos, tecidos, etc. Aqui, entende-se que variante funcional significa um fragmento que na célula pode realizar a função da proteína cuja função na célula é necessária ou a falta ou forma deficiente da mesma é patogênica. Além do mais o mRNA pode também ter regiões funcionais adicionais e/ou regiões não codificantes 3’ ou 5’. As regiões não codificantes 3’ e/ou 5’ podem ser as regiões que flanqueiam naturalmente a sequência codificante de proteína ou sequências artificiais que contribuem para a estabilização do RNA. Os versados na técnica podem determinar as sequências adequadas para isso em cada caso por experimentos de rotina.

[0021] Em uma modalidade preferida, o mRNA contém uma terminação m7GpppG, um local interno de entrada do ribossomo (IRES) e/ou

uma cauda poliA na extremidade 3' em particular a fim de melhorar a tradução. O mRNA pode ter regiões adicionais que promovam a tradução.

[0022] Em uma modalidade preferida, o mRNA é um mRNA que contém uma combinação de nucleotídeos modificados e não modificados. Preferivelmente, é um mRNA contendo uma combinação de nucleotídeos modificados e não modificados como descrito em WO2011/012316. É reportado que o mRNA descrito no mesmo apresenta uma estabilidade aumentada e imunogenicidade diminuída. Em uma modalidade preferida, em um mRNA assim modificado, 5 a 50% dos nucleotídeos de citidina e 5 a 50% dos nucleotídeos de uridina são modificados. Os nucleotídeos contendo adenosina e guanosina podem ser não modificados. Os nucleotídeos de adenosina e guanosina podem ser não modificados ou parcialmente modificados, e eles estão preferivelmente presentes em forma não modificada. Preferivelmente 10 a 35% dos nucleotídeos de citidina e uridina são modificados e Particularmente de forma preferível o teor dos nucleotídeos de citidina modificados fica em uma faixa de 7,5 a 25% e o teor dos nucleotídeos de uridina modificados em uma faixa de 7,5 a 25%. Observou-se que de fato um teor relativamente baixo, por exemplo, apenas 10% cada, de nucleotídeos de citidina e uridina modificados pode alcançar as propriedades desejadas. Particularmente, é preferido que os nucleotídeos de citidina modificados sejam resíduos de 5-metilcitidina e os nucleotídeos de uridina modificados sejam resíduos de 2-tiouridina. O mais preferivelmente, o teor de nucleotídeos de citidina modificados e o teor dos nucleotídeos de uridina modificados são 25%, respectivamente.

[0023] Em uma outra modalidade preferida, o mRNA pode ser combinado com sítios de ligação alvos, sequências de alvejamento e/ou com sítios de ligação de micro-RNA, a fim de permitir atividade do mRNA desejado apenas nas células relevantes. Em uma modalidade preferida adicional, o RNA pode ser combinado com micro-RNAs ou shRNAs à jusante

da cauda poliA 3'.

[0024] Além disso, a expressão "ácido(s) nucleico(s)" pode se referir a DNA ou RNA ou híbridos dos mesmos ou qualquer modificação dos mesmos que é conhecida no estado da técnica (vide, por exemplo, US 8278036, WO 2013/052523, WO 2011/012316, US 5525711, US 4711955, US 5792608 ou EP 302175, (Lorenz *et al.* 2004, Bioorg Med Chem Lett, 14, 4975-4977; Soutschek *et al.* 2004, Nature, 432, 173-178) para exemplos de modificações). Tal(is) molécula(s) de ácido nucleico é(são) de fita única ou dupla, linear(es) ou circular(es), natural(is) ou sintética(s), e sem nenhuma limitação de tamanho. Por exemplo, a(s) molécula(s) de ácido nucleico pode(m) ser DNA genômico, cDNA, mRNA, RNA antissentido, ribozima, ou RNAs interferentes pequenos (siRNAs), micro RNAs, antagomirs, ou RNAs de grampo de cabelo curtos (shRNAs), tRNAs ou RNAs longos de fita dupla ou um construto de que codifica tais RNAs ou quimeraplastos (Colestrauss *et al.* 1996, Science, 273, 1386-1389), ou aptâmeros, repetições palindrômicas curtas agrupadas regularmente espaçadas ("CRISPR" para clivagem de DNA específico do sítio guiado por RNA) (Cong *et al.* 2013, Science, 339, 819-823), ou RNA e DNA. A(s) dita(s) molécula(s) de ácido nucleico pode(m) ser na forma de plasmídeo, cosmídeo, cromossomos artificiais, DNA ou RNA viral, DNA bacteriófago, RNA de fita única (mRNA) ou de fita dupla codificante e não codificante e oligonucleotídeo(s), em que quaisquer modificações do estado da técnica na espinha dorsal do açúcar e/ou nas bases como descrito anteriormente e modificações 3' ou 5' são incluídas. Em uma modalidade particularmente preferida o ácido nucleico é RNA, mais preferivelmente mRNA ou siRNA, e o mais preferivelmente mRNA.

[0025] O(s) ácido(s) nucleico(s) pode(m) conter uma sequência de nucleotídeos que codifica um polipeptídeo que deve ser expresso em uma célula alvo. Métodos que são bem conhecidos pelos versados na técnica podem ser usados para construir moléculas de ácido nucleico recombinantes;

vide, por exemplo, as técnicas descritas em Sambrook *et al.*, Molecular Cloning A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory (2001) N.Y. e Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989).

[0026] Como notado anteriormente, o ácido nucleico seria compreendido como um agente terapeuticamente ativo preferido na formulação de nano ou micropartícula. Em geral, efeitos terapêuticos podem ser obtidos pela interação do ácido nucleico com moléculas e organelas celulares. Tal interação sozinha pode, por exemplo, ativar o sistema imune inato, como é o caso para certos oligonucleotídeos CpG e sequências designadas para interagir especificamente com receptores extra ou intracelulares tipo toll e outros. Além disso, a captação ou introdução de ácidos nucleicos em células pode ser destinada a levar à expressão de sequências de nucleotídeos tais como genes compreendidos no ácido nucleico, pode ser destinada à infra-regulação, silenciamento ou nocaute de expressão genética endógena como uma consequência da presença intracelular de um ácido nucleico exógeno introduzido, ou pode ser destinada à modificação de sequências de ácidos nucleicos endógenos tal como reparo, excisão, inserção ou troca de bases selecionadas ou de todos os trechos de sequências de ácidos nucleicos endógenos, ou pode ser destinada a interferência com qualquer processo virtualmente celular como uma consequência da presença intracelular e interação de um ácido nucleico exógeno introduzido. Sobre-expressão de ácidos nucleicos exógenos introduzidos pode ser destinada a compensar ou complementar a expressão genética endógena, em particular em casos onde um gene endógeno é defeituoso ou silencioso, levando a produto disfuncional nulo ou um insuficiente ou um defeituoso de expressão genética tal como é o caso com muitas doenças metabólicas e hereditárias como fibrose cística, hemofilia ou distrofia muscular para citar alguns. Sobre-expressão de ácidos nucleicos exógenos introduzidos pode também ser

destinada a fazer com que o produto da expressão interaja ou interfira em qualquer processo celular endógeno tais como a regulação de expressão genética, transdução de sinal e outros processos celulares. A sobre-expressão de ácidos nucleicos exógenos introduzidos pode também ser destinada a dar origem a uma resposta imune no contexto do organismo no qual uma célula transfectada ou transduzida reside ou é levada a residir. Exemplos são a modificação genética de células que apresentam antígeno tais como células dendríticas a fim de tê-las presente um antígeno para propósitos de vacinação. Outros exemplos são a sobre-expressão de citocinas em tumores a fim de elicitar uma resposta imune específica de tumor. Além disso, a sobre-expressão de ácidos nucleicos exógenos introduzidos pode também ser destinada a gerar células geneticamente modificadas transientemente *in vivo* ou *ex vivo* para terapias celulares tais como células T modificadas ou precursoras ou tronco ou outras células para medicina regenerativa.

[0027] Infra-regulação, silenciamento ou nocaute de expressão genética endógena para propósitos terapêuticos podem, por exemplo, ser obtidos por interferência de RNA (RNAi), com ribozimas, oligonucleotídeos antissentidos, tRNAs, RNA longo de fita dupla onde tal infra-regulação pode ser específica ou não específica da sequência e pode também levar a morte da célula como é o caso quando RNAs longos de fita dupla são introduzidos nas células. Infra-regulação, silenciamento ou nocaute de expressão genética endógena ou pré-existente pode ser útil no tratamento de doenças adquiridas, hereditárias ou que incorrem espontaneamente incluindo infecções virais e câncer. Pode também ser considerado que a introdução de ácidos nucleicos nas células pode ser praticada como uma medida preventiva a fim de prevenir, por exemplo, infecção viral ou neoplasias. Infra-regulação, silenciamento ou nocaute de expressão genética endógena podem ser exercidos no nível transcricional e no nível translacional. Múltiplos mecanismos são conhecidos pelos versados na técnica e incluem, por exemplo, modificações epigenéticas,

mudanças em estrutura de cromatina, ligação seletiva de fatores de transcrição pelo ácido nucleico introduzido, hibridização do ácido nucleico introduzido em sequências complementares em DNA, mRNA genômico ou outra espécie de RNA por pareamento de base incluindo mecanismos de pareamento de base não convencional tal como formação de tripla hélice. Similarmente, reparo genético, mudanças de base ou sequência podem ser obtidos no nível genômico e no nível de mRNA incluindo salto de éxon. Mudanças de base ou sequência podem, por exemplo, ser obtidas por clivagem de DNA específico do sítio guiado por RNA, por mecanismos de corte e colagem que exploram trans-splicing, ribozimas trans-splicing, quimeraplastos, trans-splicing de RNA mediado por spliceossoma, ou explorando íntrons do grupo II ou realvejados, ou explorando mutagênese insercional mediada por vírus ou explorando inserção genômica alvejada usando sistemas procarióticos, eucarióticos ou integrase viral. Uma vez que ácidos nucleicos são os carreadores dos planos de construção de sistemas vivos e uma vez que eles participam de muitos processos celulares de uma maneira direta e indireta, em teoria qualquer processo celular pode ser influenciado pela introdução de ácidos nucleicos nas células por fora. Notavelmente, essa introdução pode ser realizada diretamente *in vivo* e *ex vivo* em cultura de célula ou órgão seguido por transplante dos órgãos ou células assim modificadas em um recipiente. As formulações de nano ou micropartícula para uso no contexto da presente invenção com ácidos nucleicos como agente terapeuticamente ativo podem ser úteis para todos os propósitos descritos anteriormente.

[0028] Deve-se entender que as formulações de nano ou micropartícula para uso no contexto da presente invenção podem compreender um único agente terapeuticamente ativo, mas podem alternativamente compreender uma combinação de dois ou mais agentes terapeuticamente ativos, por exemplo, na forma de partículas compreendendo dois ou mais tipos de agente terapeuticamente ativo combinado em partículas

únicas, ou na forma de uma mistura de partículas que diferem no tipo de agente terapeuticamente ativo contidas nas mesmas.

Formulação da partícula

[0029] As composições de acordo com a invenção (isto é, a composição em suspensão e a composição sólida) compreendem uma formulação de nano ou micropartícula do agente terapeuticamente ativo. Como será entendido pelos versados na técnica, o “ou” é usado nesse contexto de uma maneira não exclusiva, a menos que especificamente indicado de outra forma. Assim, a referência a formulações de nano ou micropartícula engloba formulações contendo nanopartículas compreendendo o agente terapeuticamente ativo, formulações contendo micropartículas compreendendo o agente terapeuticamente ativo, e formulações contendo tanto nanopartículas quanto micropartículas compreendendo o agente terapeuticamente ativo. Por motivo de conveniência, a “formulação de nano ou micropartícula” pode ser abreviada na discussão da invenção aqui como “formulação de partícula” ou “formulação de particulado”. Similarmente, as nano ou micropartículas podem ser referidas como “as partículas”.

[0030] As partículas da formulação de nano ou micropartícula podem conter o agente terapeuticamente ativo como o único componente. Entretanto, prefere-se que as partículas contenham o agente terapeuticamente ativo em combinação com um ou mais componentes adicionais. Esses componentes adicionais são tipicamente componentes farmacologicamente aceitáveis, por exemplo, excipientes ou aditivos que são farmacologicamente aceitáveis.

[0031] A formulação de nano ou micropartícula na composição de acordo com a invenção compreende nano ou micropartículas que contêm o agente terapeuticamente ativo. A formulação de partícula pode consistir em tais nano ou micropartículas. Como usado aqui, o termo nanopartículas se refere no geral a partículas com um diâmetro na faixa de tamanho nanométrica, isto é, um diâmetro de 1 nm ou mais e abaixo de 1.000 nm. O

termo micropartículas se refere no geral a partículas com um diâmetro na faixa de tamanho micrométrica, isto é, um diâmetro de 1.000 nm ou mais e 100 μm ou menos.

[0032] A formulação de nano ou micropartícula tipicamente mostra um diâmetro de partícula médio na faixa de 1 a 4.000 nm, mais preferivelmente 2 a 2500 nm, e o mais preferivelmente 5 a 1.000 nm.

[0033] O limite superior para o diâmetro das partículas individuais na formulação de nano ou micropartícula é preferivelmente 20 μm , mais preferivelmente 10 μm e o mais preferivelmente 5 μm . Assim, como será entendido pelo exposto, uma formulação de partícula fortemente preferida seria uma com um diâmetro de partícula médio na faixa de 5 a 1.000 nm, e partículas com um diâmetro de partícula máximo de 5 μm .

[0034] Os diâmetros de partícula e o diâmetro de partícula médio da formulação de nano ou micropartícula como referido aqui podem ser convenientemente determinados por meio de espalhamento dinâmico de luz (DLS). No geral, os diâmetros e o diâmetro médio como referidos aqui são indicados como diâmetros hidrodinâmicos das partículas em um estado suspenso determinado por meio de espalhamento dinâmico de luz. Uma vez que o efeito de temperatura é levado em conta pelo equipamento de medição (por exemplo, Malvern ZetaSizer) quando se reportam os resultados, os diâmetros medidos no geral não são dependentes da temperatura. Entretanto, a medição é tipicamente realizada à temperatura ambiente (25°C). Como um meio de suspensão para medições de DLS, por exemplo, água ou água contendo o aditivo crioprotetor pode ser usada, como apropriado. No caso de uma composição sólida congelada, os diâmetros de partícula são tipicamente determinados após descongelamento da composição. Em casos onde um tamanho de partícula médio ou um diâmetro de partícula médio é indicado, a média é tipicamente a média z, a menos que indicado de outra forma.

[0035] Preferivelmente, a formulação de nano ou micropartícula tem

uma carga ativa, expressa como o peso do agente terapeuticamente ativo para o peso total das partículas na formulação de partícula, na faixa de 0,1 a 95% (p/p), mais *preferivelmente* 0,5 a 90% (p/p), o mais preferivelmente 1 a 80% (p/p).

[0036] Além do agente terapeuticamente ativo, as partículas da formulação de nano ou micropartícula para uso no contexto da presente invenção podem compreender um ou mais componentes adicionais, por exemplo, excipientes ou aditivos que são tipicamente componentes farmacologicamente aceitáveis. Por exemplo, tais componentes adicionais podem facilitar o transporte para sítios específicos ou promover a captação adicional das partículas nos sítios específicos após eles terem sido administrados a um paciente, ou eles podem ajudar a estabilizar as partículas ou o agente terapeuticamente ativo contido nas mesmas.

[0037] Se o agente terapeuticamente ativo for um ácido nucleico, um componente útil para as partículas compreendendo o ácido nucleico é um vetor viral. Tais vetores virais são conhecidos na técnica, como discutido, por exemplo, no artigo de revisão de A.C. Silva *et al.*, Current Drug Metabolism, 16, 2015, 3-16, e na literatura discutida no mesmo.

[0038] Além disso, vários polímeros são estabelecidos como excipientes para a formulação de agentes terapeuticamente ativos em formulações de partícula compreendendo nano ou micropartículas. Tais polímeros podem também prover um componente adicional para as formulações de particulado como usado no contexto da presente invenção. Por exemplo, excipientes poliméricos adequados incluem polímeros que podem ser reabsorvidos no corpo após administração das partículas a um paciente, tais como polímeros, incluindo polímeros naturais, formados de aminoácidos, carboidratos, ou de ácido lático e/ou glicólico.

[0039] Para formulação de partícula compreendendo um ácido nucleico, preferivelmente RNA, mais preferivelmente RNA de fita única, e o

mais preferivelmente mRNA, como agente terapeuticamente ativo, um componente adicional preferido é um excipiente catiônico. Um excipiente catiônico e um ácido nucleico como esses, que fornecem cargas negativas, podem formar um complexo juntos. Deve-se entender que a referência a um excipiente catiônico não exclui a presença de grupos aniônicos ou de regiões neutras no respectivo excipiente, desde que os grupos catiônicos estejam presentes em um número suficientemente alto para prover uma carga catiônica total do excipiente.

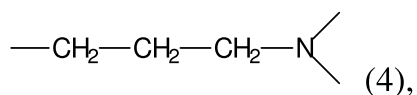
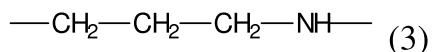
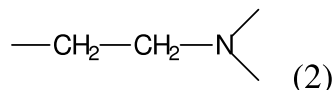
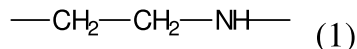
[0040] Assim, de acordo com uma modalidade preferida, as formulações de nano ou micropartícula como referido no contexto da presente invenção são formulações de partícula que compreendem um ácido nucleico, preferivelmente RNA, mais preferivelmente RNA de fita única, e o mais preferivelmente mRNA, as o agente terapeuticamente ativo na forma de um complexo formado pelo ácido nucleico e um oligômero ou polímero catiônico, preferivelmente um polímero, como um excipiente catiônico. Um complexo como esse é referido na técnica também como um poliplexo.

[0041] Tais poliplexos, e oligômeros ou polímeros adequados que são capazes de formá-los, são conhecidos na técnica. Oligômeros ou polímeros catiônicos adequados exemplares para a formação de poliplexos, que podem também ser usados nas formulações de partícula referidas no contexto da presente invenção, são discutidos em A.C. Silva *et al.*, Current Drug Metabolism, 16, 2015, 3-16, e na literatura referida nos mesmos, em J.C. Kasper *et al.*, J. Contr. Rel. 151 (2011), 246-255, em WO 2014/207231 e na literatura referida nos mesmos, e em WO 2016/097377 e na literatura referida nos mesmos.

[0042] Oligômeros ou polímeros catiônicos adequados incluem em particular oligômeros ou polímeros catiônicos compreendendo uma pluralidade de unidades em que um grupo amino é contido. Os grupos amino podem ser protonados para prover a carga catiônica do polímero.

[0043] Em um poliplexo formado a partir de um ácido nucleico e um oligômero ou polímero catiônico compreendendo uma pluralidade de unidades em que um grupo amino é contido, a razão de N/P do número de átomos de amina -nitrogênio no oligômero ou polímero catiônico para o número de grupos fosfato no ácido nucleico é preferivelmente na faixa de 1 a 100, mais preferivelmente 2 a 80, e o mais preferivelmente 3 a 60

[0044] Dentre os oligômeros ou polímeros catiônicos compreendendo uma pluralidade de grupos amino, oligômeros ou polímeros são preferidos que compreendem uma pluralidade de unidades independentemente selecionadas do seguinte (1), (2), (3) e (4):



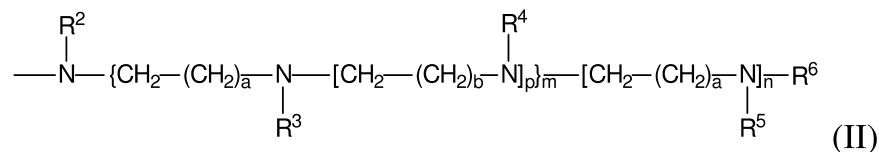
em que um ou mais dos átomos de nitrogênio das unidades de repetição (1), (2), (3) e/ou (4) podem ser protonados para prover a carga catiônica do polímero.

[0045] Particularmente preferidas como oligômeros ou polímeros catiônicos para a provisão de uma formulação de partícula são as quatro classes seguintes de oligômeros ou polímeros compreendendo uma pluralidade de unidades em que um grupo amino é contido.

[0046] Como a primeira classe preferida, poli(etileno-imina) (“PEI”) é mencionado, incluindo poli(etileno-imina) ramificada (“brPEI”).

[0047] A segunda classe preferida de oligômeros ou polímeros catiônicos são oligômeros ou polímeros compreendendo uma pluralidade de grupos da seguinte fórmula (II) como uma cadeia lateral e/ou como um grupo terminal, como eles são descritos em WO 2014/207231 (requerente ethris

GmbH):



em que as variáveis a, b, p, m, n e R² a R⁶ são definidas como a seguir, independentemente para qual grupo da fórmula (II) em uma pluralidade de tais grupos:

a é 1 e b é um número inteiro de 2 a 4; ou a é um número inteiro de 2 a 4 e b é 1,

p é 1 ou 2,

m é 1 ou 2; n é 0 ou 1 e m+n é ≥ 2; e

R² a R⁵ são, independentemente um do outro, selecionados de hidrogênio; um grupo -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ ou -CH₂-R⁷ em que R⁷ é selecionado de alquila C3-C18 ou alquenila C3-C18 tendo uma ligação dupla C-C; um grupo de proteção para um grupo amino; e uma cadeia de poli(etileno glicol);

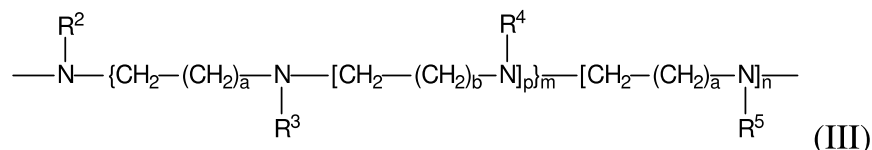
R⁶ é selecionado de hidrogênio; um grupo -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ ou -CH₂-R⁷ em que R⁷ é selecionado de alquila C3-C18 ou alquenila C3-C18 tendo uma ligação dupla C-C; um grupo de proteção para um grupo amino; -C(NH)-NH₂; uma cadeia de poli(etileno glicol); e um ligante receptor,

e em que um ou mais dos átomos de nitrogênio indicados na fórmula (II) podem ser protonados para prover um grupo catiônico da fórmula (II).

[0048] Quanto às definições preferidas adicionais desses oligômeros ou polímeros, e das variáveis contidas na fórmula (II) anteriormente, a respectiva descrição em WO 2014/207231 também se aplica para a invenção descrita aqui, a menos que especificamente indicado de outra forma. Também em termos das composições que contêm ácidos nucleicos e esses oligômeros e

polímeros na forma de poliplexos, a informação provida em WO 2014/207231 é aplicável para as formulações de partícula referidas aqui.

[0049] A terceira classe preferida de oligômeros ou polímeros catiônicos são oligômeros ou polímeros compreendendo uma pluralidade de grupos da seguinte fórmula (III) como unidades de repetição, como eles são descritos em WO 2014/207231 (requerente ethris GmbH):



em que as variáveis a, b, p, m, n e R² a R⁵ são definidas como a seguir, independentemente para qual grupo da fórmula (III) em uma pluralidade de tais grupos:

a é 1 e b é um número inteiro de 2 a 4; ou a é um número inteiro de 2 a 4 e b é 1,

p é 1 ou 2,

m é 1 ou 2; n é 0 ou 1 e m+n é ≥ 2; e

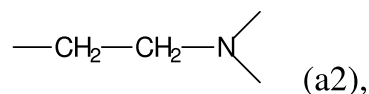
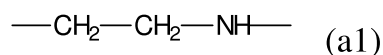
R² a R⁵ são, independentemente um do outro, selecionados de hidrogênio; um grupo $\text{---CH}_2\text{---CH(OH)---R}^7$, $\text{---CH(R}^7\text{)---CH}_2\text{---OH}$, $\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---(C=O)---O---R}^7$ ou $\text{---CH}_2\text{---CH}_2\text{---(C=O)---NH---R}^7$ ou $\text{---CH}_2\text{---R}^7$ em que R⁷ é selecionado de alquila C3-C18 ou alquenila C3-C18 tendo uma ligação dupla C-C; um grupo de proteção para um grupo amino; ---C(NH)---NH_2 ; e uma cadeia de poli(etileno glicol);

e em que um ou mais dos átomos de nitrogênio indicados na fórmula (III) podem ser protonados para prover um grupo catiônico da fórmula (III).

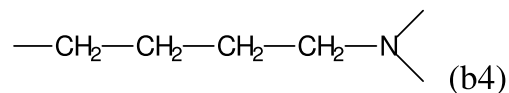
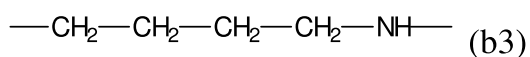
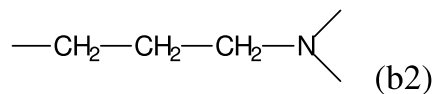
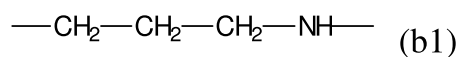
[0050] Quanto às definições preferidas adicionais desses oligômeros ou polímeros, e das variáveis contidas na fórmula (III) anteriormente, a respectiva descrição em WO 2014/207231 também se aplica para a invenção descrita aqui, a menos que especificamente indicado de outra forma. Também

em termos das composições que contêm ácidos nucleicos e esses oligômeros e polímeros na forma de poliplexos, a informação provida em WO 2014/207231 é aplicável para as formulações de partícula referidas aqui.

[0051] A quarta classe preferida de oligômeros ou polímeros catiônicos é provida por um copolímero estatístico como ele é descrito em WO 2016/097377 (requerente ethris GmbH). Ele compreende uma pluralidade de unidades de repetição (a) independentemente selecionadas de unidades de repetição das seguintes fórmulas (a1) e (a2):



e uma pluralidade de unidades de repetição (b) independentemente selecionadas de unidades de repetição das seguintes fórmulas (b1) a (b4):



e a razão molar da soma das unidades de repetição (a) da soma das unidades de repetição (b) fica na faixa de 0,7/1,0 a 1,0/0,7, e um ou mais dos átomos de nitrogênio das unidades de repetição (a) e/ou (b) contidas no copolímero podem ser protonados para prover um copolímero catiônico.

[0052] Quanto às definições preferidas adicionais desse copolímero, a respectiva descrição em WO 2016/097377 também se aplica para a invenção descrita aqui, a menos que especificamente indicado de outra forma. Como notado na mesma, um copolímero particularmente preferido é um copolímero linear que compreende unidades de repetição (a1) e (b1), ou que consiste em

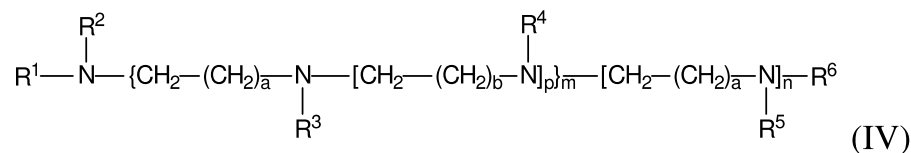
unidades de repetição (a1) e (b1). Também em termos das composições que contêm ácidos nucleicos e esses oligômeros e polímeros na forma de poliplexos, a informação provida em WO 2016/097377 é aplicável para as formulações de partícula referidas aqui.

[0053] De acordo com uma outra modalidade preferida, as formulações de nano ou micropartícula como referido no contexto da presente invenção são formulações de partícula que compreendem um ácido nucleico, preferivelmente RNA, mais preferivelmente RNA de fita única, e o mais preferivelmente mRNA, como o agente terapeuticamente ativo na forma de um complexo formado pelo ácido nucleico e um lipídio catiônico ou um lipóide catiônico como um excipiente catiônico. A menos que definido de outra forma, tais complexos englobam em particular lipoplexos, lipossomos e nanopartículas de lipídio (“LNP”) compreendendo um complexo do ácido nucleico e um lipídio catiônico ou um lipóide catiônico.

[0054] Lipídios catiônicos ou lipídios catiônicos e lipóides adequados, que podem também ser usados para a formação de um complexo com ácido nucleico no contexto da presente invenção, são conhecidos na técnica, e são discutidos por exemplo, em A.C. Silva *et al.*, Current Drug Metabolism, 16, 2015, 3-16, e na literatura referida nos mesmos, em US 2017/0267631, WO 2016/081029, WO 2011/071860, WO 2016/118697, US 8450298 B2, WO 2014/207231 e em E.R. Lee *et al.*, Human Gene Therapy 7:1701-1717, September 10, 1996. O termo “lipóide” é estabelecido para substâncias que não têm uma estrutura de um lipídio, mas mostram as características de um lipídio.

[0055] Uma classe preferida de lipóides para uso nas formulações de partícula contendo um ácido nucleico, preferivelmente RNA, mais preferivelmente RNA de fita única, e o mais preferivelmente mRNA, como o agente terapeuticamente ativo na forma de um complexo com o lipóide catiônico, por exemplo, como um lipoplexo, lipossomo ou LNP, são lipóides

tendo a estrutura da seguinte fórmula (IV), como descrito em WO 2014/207231 (requerente: ethris GmbH):



em que as variáveis a, b, p, m, n e R¹ a R⁶ são definidas como a seguir:

a é 1 e b é um número inteiro de 2 a 4; ou a é um número inteiro de 2 a 4 e b é 1,

p é 1 ou 2,

m é 1 ou 2; n é 0 ou 1 e m+n é ≥ 2; e

R¹ a R⁶ são independentemente um do outro selecionado de hidrogênio; um grupo -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ ou -CH₂-R⁷ em que R⁷ é selecionado de alquila C3-C18 ou alquenila C3-C18 tendo uma ligação dupla C-C; um grupo de proteção para um grupo amino; -C(NH)-NH₂; uma cadeia de poli(etileno glicol); e um ligante receptor; desde que pelo menos dois resíduos dentre R¹ a R⁶ sejam um grupo -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ ou -CH₂-R⁷ em que R⁷ é selecionado de alquila C3-C18 ou alquenila C3-C18 tendo uma ligação dupla C-C;

e em que um ou mais dos átomos de nitrogênio indicados na fórmula (IV) podem ser protonados para prover um lipóide catiônico da fórmula (IV).

[0056] Quanto às definições preferidas adicionais desses lipóides, e das variáveis contidas na fórmula (IV) anteriormente, a respectiva descrição em WO 2014/207231 também se aplica para a invenção descrita aqui, a menos que especificamente indicado de outra forma. Também em termos das composições que contêm ácidos nucleicos e esses lipóides na forma de

complexos, por exemplo, na forma de lipoplexos, lipossomos ou LNPs, a informação provida em WO 2014/207231 é aplicável para as formulações de partícula referidas aqui.

[0057] Um outro tipo preferido de lipídio para a provisão de um complexo de um ácido nucleico com um lipídio catiônico que pode estar contido nas formulações de partícula como referido aqui é o lipídio catiônico Genzyme Lipid 67 (GL67). Esse lipídio cationicamente derivatizado é muito útil para a complexação de ácidos nucleicos, preferivelmente RNA, mais preferivelmente RNA de fita única e o mais preferivelmente mRNA.

[0058] Para uma formulação de partícula compreendendo um complexo de um ácido nucleico formado com um lipídio catiônico ou lipóide catiônico contendo grupos amino, por exemplo, com um lipóide da fórmula (IV), a razão de N/P no lipoplexo é preferivelmente de 1 a 100, mais preferivelmente 2 a 80, e acima de tudo preferidas são as razões de N/P de 3 a 60.

[0059] Como componentes opcionais que podem estar contidos nas formulações de partícula compreendendo o agente terapeuticamente ativo na forma de um complexo de um ácido nucleico com um lipídio catiônico ou lipóide catiônico, tal como um lipoplexo, LNP ou lipossomo, menção pode ser feita de lipídios auxiliares. Eles podem ser selecionados por exemplo, de um ou mais de esteróis (tal como colesterol ou dexametasona), lipídios neutros (tais como DMPE, DOPE, DSPE, DPPE, DMPC, DOPC, DSPC, ou DPPC), esfingolipídios e lipídios peguilados (tais como DMG-PEG, DMPE-PEG ou Ceramida-PEG). Tais lipídios auxiliares podem ser usados individualmente ou em combinação de dois ou mais tipos dos mesmos. Também úteis como excipientes para uma formulação de particulado de um agente terapeuticamente ativo que compreende lipídios catiônicos ou lipóides são copolímeros de polietileno glicol (PEG) e unidades de alquilenos.

[0060] Componentes adicionais adequados para a formação de tais

complexos são referidos em A.C. Silva *et al.*, Current Drug Metabolism, 16, 2015, 3-16, e na literatura discutida nos mesmos.

[0061] Preferivelmente, a formulação de partícula compreendendo um complexo de um ácido nucleico com um lipídio catiônico ou um lipóide catiônico contém o ácido nucleico em uma quantidade de maneira tal que a razão em peso total de lipídios e lipóides (incluindo quaisquer lipídios auxiliares presentes) para o peso do ácido nucleico é na faixa de 0,1 a 200, mais preferivelmente 0,2 a 150, o mais preferivelmente 0,5 a 100.

[0062] Sob a luz da discussão anterior, ficará aparente que uma formulação de nano ou micropartícula para uso no contexto da presente invenção é também preferida em que o agente terapeuticamente ativo é mRNA, e o mRNA é compreendido na formulação de partícula na forma de um complexo com um polímero catiônico ou oligômero, ou na forma de um complexo com um lipídio catiônico ou um lipóide catiônico. Em relação aos tipos adequados e preferidos do excipiente catiônico, as considerações anteriores continuam a se aplicar. Também para essas formulações de partícula preferidas, as partículas na formulação de partícula tipicamente mostram um diâmetro de partícula médio na faixa de 1 a 4.000 nm, mais preferivelmente 2 a 2.500 nm, e o mais preferivelmente 5 a 1.000 nm. O limite superior para o diâmetro das partículas na formulação de nano ou micropartícula é preferivelmente 20 µm, mais preferivelmente 10 µm, e o mais preferivelmente 5 µm.

[0063] Além do agente terapeuticamente ativo, a formulação de partícula pode compreender, como um aditivo opcional ou como aditivos opcionais, um ou mais componentes que exercem uma função efetora durante a distribuição do agente terapêutico, e preferivelmente durante a distribuição de um ácido nucleico como o agente terapêutico a e dentro de uma célula. Tais componentes podem ser, mas não se limitando a poliânions, lipídios como descrito anteriormente, polications adicionais sem ser aqueles

discutidos anteriormente para a formação de poliplexos tais como peptídeos catiônicos, oligômeros ou polímeros de proteção, poloxâmeros (também conhecidos como plurônicos), poloxaminas, ligantes alvos, agentes endossomolíticos, peptídeos penetradores de célula e sinais, nanopartículas magnéticas e não magnéticas, inibidores de RNase, corantes fluorescentes, radioisótopos ou agentes de contraste para formação de imagem médica. A expressão “função efetora” engloba qualquer função que suporta a obtenção de um efeito biológico pretendido do agente terapeuticamente ativo da composição a ou em um alvo biológico ou nos arredores de um alvo biológico. Por exemplo, composições para distribuição de ácido nucleico foram formuladas para compreender poliânions de ácidos nucleicos não codificante ou ácido não nucleico como materiais de enchimento (Kichler *et al.* 2005, J Gene Med, 7, 1459-1467). Tais materiais de enchimento são adequados para reduzir a dose de um ácido nucleico tendo um efeito biológico pretendido mantendo ao mesmo tempo a extensão ou grau deste efeito obtido a uma dose maior de ácido nucleico na ausência de tal material de enchimento. Poliânions de ácido não nucleico também foram usados para obter expressão genética *in vivo* prolongada a toxicidade reduzida (Uchida *et al.* 2011, J Control Release, 155, 296-302). As formulações de partícula da presente invenção compreendendo um complexo de um ácido nucleico com um polímero catiônico ou oligômero podem também compreender lipídios catiônicos, aniônicos ou neutros tal como é o caso em lipopoliplexos (Li e Huang em “Nonvirals Vectors for Gene Therapy”, Academic Press 1999, Chapter 13, 295-303). Lipopoliplexos podem ser preparados vantajosamente a partir de polímeros correspondendo às fórmulas (II) ou (III) como mostrado anteriormente com lipídeos correspondendo à fórmula (IV) como mostrado anteriormente. Além disso, a formulação de partícula usada na presente invenção pode compreender oligo ou polications sem ser aqueles discutidos anteriormente para a formação de poliplexos. Tais polications adicionais

podem ser úteis para alcançar um grau desejado de compactação de um ácido nucleico ou, no caso de peptídeos policatiônicos, podem ter uma função de sinal de localização nuclear tal como descrito previamente (Ritter *et al.* 2003, J Mol Med, 81, 708-717). Polímeros de proteção, tal como poli(etileno glicol) (PEG), podem igualmente ser compreendidos nas formulações de partícula usadas no contexto da presente invenção e são usados frequentemente para estabilizar, por exemplo, complexos de ácidos nucleicos com excipiente catiônicos contra agregação e/ou interações indesejadas em um ambiente biológico (opsonização), por exemplo, interações com componentes de soro, células de sangue ou matriz extracelular. Proteção pode também ser adequada para reduzir a toxicidade de composições compreendendo ácido nucleico (Finsinger *et al.* 2000, Gene Ther, 7, 1183-1192). Por exemplo, polímeros de proteção tal como PEG podem ser covalentemente acoplados diretamente a outros oligômeros ou polímeros, ou a lipídios ou lipídeos que podem estar presentes nas formulações de partícula. O acoplamento pode ser obtido na espinha dorsal do polímero, preferivelmente, se viável, nas extremidades terminais de uma espinha dorsal de polímero ou um dendrímero. Entretanto, o acoplamento pode também ser obtido nos grupos amino contidos nas fórmulas (1) a (4), (II), (III), (IV) ou qualquer um de (a1), (a2) ou (b1) a (b4) descritos anteriormente.

[0064] Outros polímeros de proteção exemplares descritos na literatura que podem ser componentes úteis para uma formulação de partícula compreendendo um complexo de um ácido nucleico com um excipiente catiônico, incluem hidroxietil amido (HES; Noga *et al.* Journal of Controlled Disease, 2012. 159(1): 92-103, a PAS-polypeptide (Pro, Ala, Ser polypeptide: Schlapschy et al. Protein Eng Des Sel. 2013 Aug; 26(8):489-501 ou Polysarcosine (Psar,: Heller *et al.* Macromol Biosci 2014; 14: 1380-1395).

[0065] Ligantes alvos podem ser úteis, por exemplo, em formulações de partícula para distribuição de ácido nucleico para transfecção preferencial e

melhorada de células alvos (Philipp e Wagner em “Gene and Cell Therapy – Therapeutic Mechanisms and Strategy”, 3rd Edition, Chapter 15. CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton 2009). Um ligante alvo pode ser qualquer composto que confere às composições da presente invenção uma função de reconhecimento de alvo e/ou ligação de alvo de uma maneira direta ou indireta. Ligantes alvos exemplares são a prostaciclina análoga descrita em WO 2011/076391, tal como Iloprosta ou Treprostinila. Um anticorpo pode também agir como um ligante alvo. Como ligantes para nano ou micropartículas, ácido fólico e N-acetil galactosamina podem ser mencionados. Em termos mais gerais, um alvo é uma estrutura biológica distinta à qual um ligante alvo pode se ligar especificamente por meio de interação molecular e onde tal ligação finalmente levará ao acúmulo preferencial do agente terapêutico, tal como um ácido nucleico, compreendido na composição em um tecido alvo e/ou a ou em uma célula alvo. Similarmente às cadeias PEG (ou HES e PSar), ligantes alvos podem ser acoplados, por exemplo, às extremidades terminais de uma espinha dorsal de polímero ou um dendrímero. Entretanto, o acoplamento pode também ser obtido nos grupos das fórmulas (1) a (4), (II), (III), (IV) ou qualquer um de (a1), (a2) ou (b1) a (b4) descritos anteriormente.

[0066] Além disso, agentes endossomolíticos tais como peptídeos endossomolíticos (Plank *et al.* 1998, Adv Drug Deliv Rev, 34, 21-35) ou qualquer outro composto que é adequado para intensificar a liberação endossomal de um ácido nucleico endocitosado são componentes úteis de composições das presentes invenções. Similarmente, peptídeos penetradores de célula (em um outro contexto também conhecidos como domínios de transdução de proteína) (Lindgren *et al.* 2000, Trends Pharmacol Sci, 21, 99-103) podem ser componentes úteis da composição da presente invenção a fim de mediar a distribuição intracelular de um ácido nucleico. O assim chamado peptídeo TAT cai nessa classe e também tem função de localização nuclear

(Rudolph *et al.* 2003, J Biol Chem, 278, 11411-11418).

Aditivo crioprotetor

[0067] Como um componente adicional além da formulação de nano ou micropartícula, as composições de acordo com a invenção compreendem um aditivo crioprotetor que é selecionado de alcanos C_3 - C_5 substituídos com um ou dois grupos hidróxi. Como será entendido pelos versados na técnica, esses alcanos substituídos podem ser alcanos lineares ou ramificados. Eles têm 3 a 5 átomos de carbono. Dependendo do número de substituintes hidróxi, eles podem ser referidos como mono ou diálcoois, ou como alcanóis ou alcanodióis.

[0068] Preferivelmente, o aditivo crioprotetor compreende pelo menos um grupo hidróxi secundário (por exemplo, um grupo hidróxi secundário e nenhum adicional, ou um grupo hidróxi secundário e um primário, ou dois grupos hidróxi secundários).

[0069] Mais preferivelmente, o aditivo crioprotetor é selecionado de 1,2-propanodiol, 2-propanol, 1,2-butanodiol, e 1,3-butanodiol. O mais preferivelmente, o aditivo crioprotetor é 1,2-propanodiol.

Composições

[0070] Como notado anteriormente, a invenção provê como um primeiro aspecto uma composição em suspensão e como um segundo aspecto uma composição sólida, cada uma das quais compreende a formulação de nano ou micropartícula do agente terapeuticamente ativo e o aditivo crioprotetor que foram discutidos em detalhes adicionais anteriormente.

[0071] Uma vez que as composições de acordo com a invenção contêm um agente terapeuticamente ativo e são adequadas para a administração do agente terapeuticamente ativo a um paciente, elas podem ser referidas como composições terapêuticas ou composições farmacêuticas.

[0072] Em particular, a composição em suspensão de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção compreende:

uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi.

[0073] Como será percebido, a informação a respeito das modalidades adequadas e preferidas do agente terapêutico, de sua formulação de partícula, e do aditivo crioprotetor continua a se aplicar nesse contexto.

[0074] A composição em suspensão preferivelmente compreende as partículas da formulação de partícula em uma quantidade de maneira a prover agente terapeuticamente ativo, que é contido na formulação de partícula, a uma concentração de 0,01 a 50 mg/ml, mais preferivelmente 0,02 a 30 mg/ml, com base no volume total da composição.

[0075] O aditivo crioprotetor é preferivelmente contido na composição em suspensão a uma concentração de 0,5 a 50% em p/v, mais preferivelmente 1 a 40% em p/v, o mais preferivelmente 1 a 30% em p/v, onde o valor de porcentagem indica o peso do aditivo crioprotetor em g por 100 ml do volume total da composição. Tipicamente, o aditivo crioprotetor é contido, preferivelmente dissolvido, na fase líquida em que a formulação de partícula é suspensa. Entretanto, ele pode também ser parcialmente associado com as partículas suspensas na fase líquida.

[0076] A fase líquida da composição em suspensão de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção tipicamente contém água como um solvente. Preferivelmente, 50% ou mais, mais preferivelmente 70% ou mais em volume (com base no volume total da fase líquida a 20°C) são fornecidos por água. Mais preferivelmente, água e o aditivo crioprotetor são os únicos solventes contidos na fase líquida.

[0077] Como aditivos opcionais adicionais exemplares da fase líquida, um ou mais selecionados de sais, açúcar, solventes orgânicos e tampões podem ser mencionados.

[0078] Como implícito pelo termo “suspensa”, a formulação de nano ou micropartícula do agente terapeuticamente ativo forma uma fase sólida descontínua na fase líquida contínua.

[0079] No geral, prefere-se que a composição em suspensão seja provida como uma composição em suspensão bifásica com uma fase líquida contínua compreendendo o aditivo crioprotetor, opcionalmente em combinação com aditivos adicionais dissolvidos no mesmo, e a formulação de nano ou micropartícula do agente terapeuticamente ativo suspensa como uma fase sólida descontínua no mesmo.

[0080] A composição sólida do segundo aspecto compreende:
uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo, e
pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi,
e é obténível congelando a composição de acordo com o primeiro aspecto.

[0081] A composição sólida contém os mesmos componentes da composição em suspensão que podem ser congelados para obter a composição sólida. Assim, a informação a respeito das modalidades adequadas e preferidas do agente terapêutico, de sua formulação de partícula, do aditivo crioprotetor, e da fase líquida e seus componentes fornecidos para a composição em suspensão continua a se aplicar para a composição sólida. Entretanto, como será percebido pelos versados na técnica, a composição sólida e a composição em suspensão diferem em que a fase líquida da composição em suspensão foi solidificada na composição sólida. Até esse ponto, a composição sólida contém uma dispersão da formulação de nano ou micropartícula do agente terapêutico em uma fase sólida contínua de um líquido congelado. Em linha com o exposto, o aditivo crioprotetor é tipicamente contido na fase contínua em que a formulação de partícula é

dispersa.

[0082] Em vista do exposto, ficará aparente que composições são também preferidas como a composição em suspensão ou composição sólida de acordo com a invenção que compreendem (i) uma formulação de nano ou micropartícula em que o agente terapeuticamente ativo é mRNA, e o mRNA é compreendido na formulação de partícula na forma de um complexo com um polímero catiônico ou oligômero, ou na forma um complexo com um lipídio catiônico ou um lipoide catiônico, e (ii) 1,2 propanodiol como um aditivo crioprotetor. Em relação aos tipos adequados e preferidos do polímero catiônico ou oligômero, e em relação aos tipos preferidos de lipídios catiônicos e lipoide catiônicos, as considerações anteriores continuam a se aplicar. Também para essas composições preferidas, as partículas na formulação de partícula tipicamente mostram um diâmetro de partícula médio na faixa de 1 a 4.000 nm, mais preferivelmente 2 a 2500 nm, e o mais preferivelmente 5 a 1.000 nm. O limite superior para o diâmetro das partículas na formulação de nano ou micropartícula é preferivelmente 20 μm , mais preferivelmente 10 μm , e o mais preferivelmente 5 μm .

Aspectos Farmacêuticos

[0083] A composição em suspensão de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção é adequada para administrar o agente terapeuticamente ativo contido na mesma a um sujeito. Como explicado anteriormente, a composição tem a vantagem inesperada, quando comparada com as composições de partícula contendo outros crioprotetores, de que pode ser mantida em um estado congelado enquanto a agregação das partículas durante ou após congelamento é prevenida, e enquanto a funcionalidade para administração ao ou por meio do trato respiratório, em particular administração pulmonar ou administração nasal, é mantida. Portanto, uma via preferida de administração para a composição em suspensão é a administração ao ou por meio do trato respiratório, em particular administração pulmonar ou

administração nasal.

[0084] Entretanto, será percebido pelos versados na técnica que as composições de acordo com a invenção podem também ser administradas por meio de outras vias de administração que são conhecidas na técnica para formulações de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo, tal como a administração intravenosa na forma de uma suspensão, por exemplo, para explorar o efeito que a agregação de partícula durante ou após congelamento é prevenida pelo agente crioprotetor. Nesse contexto, observou-se que a presença do alcano C₃-C₅ substituído com um ou dois grupos hidróxi pode ter um efeito benéfico na eficiência do agente terapêutico, especialmente se o agente terapêutico for um ácido nucleico, preferivelmente RNA, mais preferivelmente um RNA de fita única, e o mais preferivelmente mRNA, se a composição em suspensão for administrada por meio de vias alternativas, tal como administração intravenosa.

[0085] Se o agente terapeuticamente ativo for um ácido nucleico, preferivelmente RNA, mais preferivelmente um RNA de fita única, e o mais preferivelmente mRNA, o ácido nucleico pode ser distribuído às células alvos ao ou por meio do trato respiratório. A expressão “distribuída às células alvos” preferivelmente significa transferência do RNA, preferivelmente RNA de fita única tal como mRNA, para a célula.

[0086] A composição pode ser administrada ao sujeito a uma dose adequada. O regime de dosagem será determinado pelo médico atendente e fatores clínicos. Como é bem conhecido nas técnicas médicas, dosagens para qualquer um sujeito depende de muitos fatores, incluindo o tamanho do sujeito, área da superfície corpórea, idade, do composto particular a ser administrado, sexo, tempo e via de administração, saúde geral, e outros fármacos que são administrados simultaneamente. Uma dose típica de substâncias terapeuticamente ativas pode ser, por exemplo, na faixa de 1 ng a diversos gramas. Aplicado ao caso de preferido de terapia de (m)RNA, a

dosagem de um (m)RNA para expressão ou para inibição de expressão deveria corresponder a essa faixa; entretanto, doses abaixo ou acima dessa faixa exemplar são previstas, especialmente considerando os fatores supramencionados. No geral, o regime como uma administração regular da composição farmacêutica deveria ser em unidades na faixa de 0,01 µg a 10 mg por quilograma de peso corpóreo por dia. Se o regime for uma infusão contínua, ele também deve ser em unidades na faixa de 1 µg a 10 mg por quilograma de peso corpóreo, respectivamente. O progresso pode ser monitorado por avaliação periódica. As dosagens variarão, mas uma dosagem preferida para administração de (m)RNAs como constituintes da composição da presente invenção é de aproximadamente 10^6 a 10^{19} cópias da molécula de (m)RNA.

[0087] Dispositivos para formar um aerossol a partir de uma composição de particulado suspensa em um líquido ou para nebulizar uma composição como essa são conhecidos na técnica e são comercialmente disponíveis. Eles podem ser usados a fim de realizar a administração da composição em suspensão de acordo com o primeiro aspecto da invenção ao ou por meio do trato respiratório, em particular administração pulmonar. Para a administração por meio do nariz, por exemplo, um dispositivo de pulverização nasal ou infusão nasal pode ser usado.

[0088] Assim, um aspecto da presente invenção se refere a um dispositivo para formar um aerossol a partir de uma composição de particulado suspensa em um líquido ou para nebulizar uma composição como essa, cujo dispositivo compreende a composição em suspensão de acordo com a presente invenção. O dispositivo é preferivelmente um inalador selecionado de um inalador de dose medida, um nebulizador, e um dispositivo de pulverização nasal.

[0089] Também para as composições de acordo com a presente invenção usadas nos dispositivos anteriores, a informação provida

anteriormente com modalidades preferidas continua a se aplicar. Assim, por exemplo, composições em suspensão preferidas usadas em tais dispositivos compreendem (i) uma formulação de nano ou micropartícula em que o agente terapeuticamente ativo é mRNA, e o mRNA é compreendido na formulação de partícula na forma de um complexo com um polímero catiônico ou oligômero, ou na forma de um complexo com um lipídio catiônico ou um lipoide catiônico, e (ii) 1,2 propanodiol como um aditivo crioprotetor. Em relação a tipos adequados e preferidos do polímero catiônico ou oligômero, e em relação aos tipos preferidos de lipídios catiônicos e lipoide catiônicos, as considerações anteriores continuam a se aplicar. Também para essas composições preferidas, as partículas na formulação de partícula tipicamente mostram um diâmetro de partícula médio na faixa de 1 a 4.000 nm, mais preferivelmente 2 a 2500 nm, e o mais preferivelmente 5 a 1.000 nm. O limite superior para o diâmetro das partículas na formulação de nano ou micropartícula é preferivelmente 20 μm , mais preferivelmente 10 μm , e o mais preferivelmente 5 μm .

[0090] Como explicado anteriormente, as composições em suspensão de acordo com a invenção podem ser convenientemente administradas após a preparação, armazenamento em um estado congelado, e recuperação por descongelamento. Entretanto, deve-se entender que composições em suspensão de acordo com a invenção podem também ser administradas diretamente após sua preparação, e observou-se que a presença do alcano C₃-C₅ substituído com um ou dois grupos hidróxi pode ter um efeito benéfico na eficiência do agente terapêutico, especialmente se o agente terapêutico for um ácido nucleico, preferivelmente RNA, mais preferivelmente um RNA de fita única, e o mais preferivelmente mRNA, mesmo em uma composição recém-preparada.

[0091] Assim, a presente invenção também provê a composição em suspensão de acordo com a presente invenção para uso no tratamento ou

prevenção de uma doença, preferivelmente em que a composição deve ser administrada ao ou por meio do trato respiratório. Mais preferivelmente, a composição deve ser administrada por meio de administração pulmonar ou por meio de administração nasal. Pacientes aos quais a composição pode ser administrada compreendem animais e humanos.

[0092] Também disponibilizado pela presente invenção é um método de tratamento, compreendendo administrar a composição em suspensão da presente invenção a um paciente, preferivelmente por meio de administração ao ou por meio do trato respiratório, mais preferivelmente por meio de administração pulmonar ou administração nasal, a fim de ter o agente terapeuticamente ativo contido na dita composição para causar um efeito preventivo ou terapêutico. Também nesse contexto, o termo “paciente” compreende animais e humanos.

[0093] Também para as composições de acordo com a presente invenção para uso no tratamento ou prevenção de uma doença, a informação provida anteriormente com modalidades preferidas continua a se aplicar. Assim, por exemplo, composições em suspensão preferidas para uso no tratamento ou prevenção de uma doença, compreendem (i) uma formulação de nano ou micropartícula em que o agente terapeuticamente ativo é mRNA, e o mRNA é compreendido na formulação de partícula na forma de um complexo com um polímero catiônico ou oligômero, ou na forma um complexo com um lipídio catiônico ou um lipoide catiônico, e (ii) 1,2 propanodiol como um aditivo crioprotetor. Em relação aos tipos adequados e preferidos do polímero catiônico ou oligômero, e em relação aos tipos preferidos de lipídios catiônicos e lipoide catiônicos, as considerações anteriores continuam a se aplicar. Também para essas composições preferidas, as partículas na formulação de partícula tipicamente mostram um diâmetro de partícula médio na faixa de 1 a 4.000 nm, mais preferivelmente 2 a 2500 nm, e o mais preferivelmente 5 a 1.000 nm. O limite superior para o

diâmetro das partículas na formulação de nano ou micropartícula é preferivelmente 20 μm , mais preferivelmente 10 μm , e o mais preferivelmente 5 μm .

[0094] Como notado anteriormente, a administração pode ser realizada diretamente após a preparação da composição, mas o efeito do aditivo crioprotetor é pronunciado se a administração for realizada após a composição em suspensão ter sido congelada e descongelada pelo menos uma vez.

[0095] Administrando a composição em suspensão da presente invenção, doenças podem ser tratadas ou prevenidas. O termo “doença” se refere a qualquer condição patológica concebível que pode ser tratada, prevenida ou vacinada empregando a composição da presente invenção. As ditas doenças podem, por exemplo, ser herdadas, adquiridas, infecciosas ou não infecciosas, relacionadas a idade, cardiovasculares, metabólicas, intestinais, neoplásticas (em particular câncer) ou genética. Uma doença pode ser baseada, por exemplo, em irregularidades de processos fisiológicos, processos moleculares, reações bioquímicas em um organismo que por sua vez pode ser baseado, por exemplo, no equipamento genético de um organismo, nos fatores comportamentais, sociais ou ambientais tal como a exposição a produto químico ou radiação. A composição em suspensão de acordo com a presente invenção é particularmente adequada para uso no tratamento ou prevenção de uma doença pulmonar.

[0096] Se, em linha com uma modalidade preferida descrita anteriormente, o agente terapeuticamente ativo for RNA, mais preferivelmente RNA de fita única, e o mais preferivelmente mRNA, a composição em suspensão da presente invenção pode ser para uso em uma terapia baseada em RNA. A molécula de RNA, preferivelmente a molécula de mRNA, compreende uma sequência que codifica uma proteína e, dessa maneira, pode ser usada em terapias baseadas em RNA em que o RNA,

preferivelmente o mRNA, codifica um polipeptídeo ou proteína terapeuticamente ou farmacologicamente ativo tendo um efeito terapêutico ou preventivo. Assim, em modalidades preferidas, a composição em suspensão da presente invenção pode ser para uso em terapias baseadas em RNA no tratamento ou prevenção de uma doença como citado na Tabela seguinte. Dessa maneira, terapias baseadas em RNA de acordo com a presente invenção podem ser para uso no tratamento ou prevenção de uma doença como citado na Tabela seguinte.

[0097] Assim, a composição em suspensão da presente invenção pode ser para uso em terapias baseadas em RNA em casos onde os defeitos do gene descrito na Tabela seguinte levam a uma doença que pode então ser tratada ou prevenida por uma terapia de substituição de transcrito/terapia de substituição de enzima com a molécula de RNA, preferivelmente a molécula de mRNA, da presente invenção, em que a molécula de RNA codifica uma versão intacta da proteína ou um fragmento funcional da mesma compensando o gene defeituoso descrito.

[0098] Em outras modalidades, a composição em suspensão da presente invenção pode ser para uso em terapias baseadas em RNA de acordo com a presente invenção em que o RNA, preferivelmente o mRNA, codifica um polipeptídeo, proteína ou peptídeo terapeuticamente ou farmacologicamente ativos tendo um efeito terapêutico ou preventivo, em que os ditos polipeptídeo, proteína ou peptídeo são selecionados do grupo codificado pelos genes como esboçado na Tabela seguinte.

[0099] A composição em suspensão da presente invenção é particularmente adequada para uso em terapias baseadas em RNA no tratamento ou prevenção de doenças pulmonares. Como doenças exemplares, Alfa-1-antitripsina, Asma, Fibrose cística, disfunção de metabolismo do tensoativo ou discinesia ciliar Primária como citado na Tabela seguinte podem ser mencionadas.

[00100] Em outras modalidades exemplares, a composição em suspensão da presente invenção pode ser para uso em terapias baseadas em RNA no tratamento ou prevenção de doenças lisossomais como doença de Gaucher, doença de Fabry, MPS I, MPS II (síndrome de Hunter), MPS VI e Doenças de armazenamento do glicogênio tal como, por exemplo, doença de armazenamento de glicogênio tipo I (doença de von Giercke), tipo II (doença de Pompe), tipo III (Doença de Cori, tipo IV (doença de Andersen, tipo V (doença de McArdle, tipo VI (doença de Hers), tipo VII (doença de Tauri), tipo VII, tipo IX, tipo X, tipo XI (síndrome de Fanconi-Bickel), tipo XI, ou tipo 0. Terapias de substituição de transcrito/terapias de substituição de enzima benéficamente não afetam o defeito genético fundamental, mas aumentam a concentração da enzima na qual o paciente é deficiente. Como um exemplo, em doença de Pompe, a terapia de substituição de transcrito/terapia de substituição de enzima substitui a enzima alfa-glucosidase ácida Lizossomal deficiente (GAA).

[00101] De acordo com exemplos adicionais, terapias baseadas em RNA de acordo com a presente invenção podem ser para uso no tratamento de câncer, uma doença cardiovascular, uma infecção viral, uma disfunção imune, uma doença autoimune, um distúrbio neurológico, distúrbios metabólicos herdados ou um distúrbio genético ou qualquer doença onde uma proteína ou fragmento de proteína produzida em uma célula pode ter um efeito benéfico para o paciente. Exemplos de câncer incluem câncer de cabeça e pescoço, câncer de mama, câncer renal, câncer de bexiga, câncer de pulmão, câncer de próstata, câncer ósseo, câncer de cérebro, câncer cervical, câncer anal, câncer de cólon, câncer colorretal, câncer de apêndice, câncer de olho, câncer gástrico, leucemia, linfoma, câncer de fígado, câncer de pele, câncer ovariano, câncer de pênis, câncer pancreático, câncer testicular, câncer da tireoide, câncer vaginal, câncer vulvar, câncer endometrial, câncer cardíaco e sarcoma. Exemplos de doenças cardiovasculares incluem aterosclerose, doença

cardíaca coronária, doença cardíaca pulmonar e cardiomiopatia. Exemplos de disfunções imunes e doenças autoimunes incluem, mas não se limitando a doenças reumática, esclerose múltipla e asma. Exemplos de infecções virais incluem, mas não se limitando a infecções com vírus da imunodeficiência humana, vírus simplex da herpes, papilomavírus humano bem como vírus da hepatite B e C. Exemplos de distúrbio neurológicos incluem, mas não se limitando a doença de Parkinson, esclerose múltipla, e demência. Exemplos de distúrbios metabólicos herdados incluem, mas não se limitando a doença de Gaucher e Fenilcetonúria.

Tabela: Exemplos não limitantes de genes humanos e distúrbios genéticos

Doença	Patologia	Gene, hereditariedade
Doenças do sangue		
Anemia de Fanconi	Anemia e neutropenia, evidência de que um mecanismo de reparo de DNA é afetado	FANCA, autossômica recessiva
Hemofilia-A	Hemorragia anormal	Fator de Coagulação VIII, X-cromossômica recessivo
Hemofilia-B	Hemorragia anormal	Fator de Coagulação IX, X-cromossômica recessivo
Esferocitose Hereditária (vários tipos)	eritrócito em formato esférico (esferócitos)	Anquirina (ANK1)
Hemoglobinúria paroxística noturna	Anemia e presença de sangue na urina	PIG-A, X-cromossômica
Porfíria cutânea tarda	Sobreprodução de heme, sobrecarga de ferro	Uroporfirinogênio decarboxilase (UROD), autossômica recessiva
Imunodeficiência combinada grave (SCID)	Devido a imunodeficiência grave da síntese de DNA prejudicada em imunidade humoral e celular	Adenosina deaminase, autossômica recessiva, IL-2R- γ , JAK3, (IL-7R- α , RAG1/2, Artemis, CD3 δ , CD3 ϵ
Anemia da célula falciforme	Hemoglobina anormal (HbS)	β -Hemoglobina (HB), autossômica recessiva
Talassemia (form α e β)	Falta de hemoglobina α ou β resultando em anemia	Deleção de HBA1 e/ou HBA2,
Doença de Von Willebrand (três tipos conhecidos, Tipo-III é mais grave)	Hemorragia anormal, hemorragia similar à hemofilia A e B	Formas autossômicas dominantes e recessivas
Câncer		
Melanoma maligno	Mutação P16 leva a proliferação descontrolada de fibroblastos	Inibidor de quinase dependente de ciclina (CDKN2)
Neurofibromatose (2 tipos)	Tumores que começam em nervos auditivos leva a surdez	NF1, NF2, autossômica dominante
Surdez (Ouvido)		
Surdez	Perda de audição	Surdez-1A (DFNB1), autossômica recessiva

Síndrome de Pendred	Perda de audição	Pendrina (PDS), autossômica recessiva
Coração		
Ataxia telangiectasia	Reparo ao dano de DNA perturbado,	ATM,
Aterosclerose	Aumento de colesterol no sangue	apoE,
Síndrome de LQT (QT Longo)	Defeito no canal de potássio	LQT1 e outros genes
Síndrome de Von-Hippel Lindau	Crescimento anormal de vasos sanguíneos, pode levar ao câncer	VHL, autossômica dominante
Síndrome de Beuren-William	Deleção de elastina resulta em defeitos vasculares, estenose aórtica supra-avalvular	Deleção de elastina e genes de quinase LIM
Distúrbios metabólicos e doenças de armazenamento do glicogênio		
Adrenoleucodistrofia	Transporte e metabolismo do ácido graxo perturbado	ABCD1, X-cromossômica
Alcaptonúria	Defeito do metabolismo de nitrogênio, Urina torna-se escura quando exposta a oxigênio	Oxidase Homogentísica, autossômica recessiva
Diabetes tipo I	Produção de insulina perturbada	IDDM1, IDDM2, GCK, ...
Galactosemia	distúrbio de metabolismo da galactose	Galactose-1-fosfato gene uridiltransferase (GALT), autossômica recessiva
Doença de Gauche	Distúrbio de metabolismo de gordura	Glucocerebrosidase
Má absorção da Glicose Galactosidase	Transporte de glicose e galactose perturbado fora do lúmen intestinal resultando em diarreia	SGLT1, autossômica recessiva
Doença de armazenamento de glicogênio Tipo I, doença de Von-Gierke	Acúmulo de glicose no fígado e rim	Glicose-6-Fosfatase, autossômica recessiva
Doença de armazenamento de glicogênio Tipo II, doença de Pompe	Acúmulo de glicogênio em fígado, coração, músculo esquelético, cardiomegalia	α -1-Glucosidase, autossômica recessiva
Doença de armazenamento de glicogênio Tipo III, doença de Cori	Acúmulo de glicogênio em fígado, coração, músculo esquelético, hepatomegalia	Enzima desramificante, autossômica recessiva
Doença de armazenamento de glicogênio Tipo V, doença de McArdle	Não pode utilizar glicogênio em células do músculo	Fosforilase muscular, autossômica recessiva
Glicose-6-Fosfato Desidrogenase	Incapacidade de manter glutatona leva a anemia hemolítica	G6PD, X-cromossômica recessivo
Hemocromatose Hereditária (4 tipos)	Excesso de ferro no corpo (esp. fígado) devido a absorção de ferro excessiva no intestino	Hemocromatose (HFE)
Homocistinúria	Defeito do metabolismo de nitrogênio	Defeito de cistationa sintetase, autossômica recessiva
Síndrome de Lesh Nyhan	Acúmulo de ácido úrico levando a gota, pedras na ureia e perda muscular	HPRT1, X-cromossômica

Doença da Urina do Xarope de Bordo	Defeito do metabolismo do aminoácido leva ao acúmulo de α -Cetoacidose e morte nos primeiros meses se não tratada	Alfa-desidrogenase de cadeia ramificada (BCKDH)
Síndrome de Menk	Capacidade reduzida de asorver cobre, leva a morte em infância se não tratada	ATP7A , X-cromossômica recessivo
Obesidade	Peso corpóreo elevado	Poligênico, níveis de leptina elevados podem desempenhar um papel
Fenilcetonúria	Incapacidade de romper Fenilalanina em tirosina leva a retardo mental	Fenilalanina hidrolase (PAH), autossômica recessiva
Doença de Tangier	níveis reduzidos de lipoproteínas de alta densidade de plasma	Gene do cassete-1 de ligação de ATP (ABCA1)
Síndrome de Zellweger (leva a morte em crianças)	Altos níveis de ferro e cobre no sangue	PXR1 (receptor na superfície de peroxissomas)
Doença de Wilsons	Acúmulo de cobre no cérebro e fígado	ATP7B (ATPase tipo P), autossômica recessiva
Sistema musculoesquelético		
Acondroplasia	Estatura pequena com uma cabeça grande devido a proliferação lenta de condrócitos	Receptor do fator de crescimento do fibroblasto 3 (FGF3R),
Síndrome de Charcot-Marie-Tooth e its mais grave form Dejerina-Sottas Síndrome	Degeneração dos músculos nos membros	Diferentes formas causadas por diferentes mutações genéticas, autossômica recessiva e X-cromossômica
Síndrome de Cockayne (2 tipos)	Envelhecimento prematuro e estatura pequena, perda de reparo de DNA “no voo”	proteína de complementação através de reparo por excisão de grupo 8 (ERCC8)
Displasia condroectodérmica	Má formação de ossos e polidactilia	EVC, autossômica recessiva
Displasia distrófica (DTD)	Mãos mal formadas, defeito do transportador de sulfato	Gene DTDST
Distrofia muscular de Duchenne	Alargamento de tecido do nariz músculo com subsequente perda de função	DMD, X-cromossômica recessivo
Fibrodisplasia Ossificante Progressiva	Formação óssea heterotópica	NOG, BMP, Autossômica dominante
Ataxia de Friedreich	Alargamento do coração e perda progressiva de coordenação muscular	Frataxina, autossômica recessiva
Hipofosfatasia	Produção de uma versão anormal de fosfatase alcalina afetando o processo de mineralização	ALPL, autossômica recessiva
Síndrome de Marfan	Distúrbio do tecido conectivo devido a deficiência de fibrilina	Fibrilina 1 (FBN), autossômica dominante
Distrofia miotônica (início de ação durante idade adulta jovem)	Defeito de proteína quinase em células do músculo esquelético	Proteína quinase da distrofia miotônica (DMPK), autossômica dominante
Osteogênese imperfeita (vários tipos)	Defeito em formação de colágeno tipo-I leva a múltiplas fraturas após nascimento	COL1A1, COL1A2

Síndrome de Prader-Willi	Tono muscular diminuído e retardo mental	SNRPN (ribonucleoproteína pequena N) deletada devido a uma deleção no cromossomo 15
Neurônios e Cérebro		
Doença de Alzheimer	Produção de amiloide aumentada, incapacidade progressiva para lembrar fatos	Poligênico, PS1, PS2, ...
Esclerose amiotrófica lateral (ALS) (várias formas)	Degeneração progressiva de células do neurônio motor (defeito em eliminação de radicais superóxidos)	Superóxido dismutase 1 (SOD1), vários genes envolvidos
Síndrome de Angelman	Retardo mental com riso inadequado	Impressão genômica no cromossomo 15
Piruvato desidrogenase	Defeitos neurológicos se não tratada	Piruvate desidrogenase, autossômica recessiva
Doença de Refsum	Acúmulo de ácido fitânico leva a neuropatia periférica	Fitanoil-CoA hidrolase (PHYH), autossômica recessiva
síndrome de Rett	Retardo mental com desenvolvimento preso entre 6 e 18 meses de idade	Proteína-2 de ligação de Metil-CpG (MECP2), X-cromossômica dominante
Doença de Tay-Sachs (várias formas de gravidade)	Ruptura perturbada de gangliosídeo GM2 leva a dano neurológico	HEXA (β -hexosaminidase A), autossômica recessiva
Doença de LaFora	forma agressiva de epilepsia	EPM2A, autossômica recessiva
Tremor essencial (formas variáveis)	Tremor incontrolável	ETM1, ETM2, autossômica dominante
Síndrome do X frágil	Falta de proteína de ligação de RNA do FMR1, retardo mental	gene FMR1 não é expresso devido a um amplificação CGG na região 5'UTR
Doença de Huntington	Demência progressiva com início de ação na idade adulta	HTT (huntingtina), autossômica dominante
Intestino		
Síndrome de Bartter (3 tipos)	Doença renal	Gene B do canal de cloro renal (CLCNKB), autossômica recessiva
Doença do rim policístico (2 tipos)	doença renal	PDK1, PDK2, autossômica dominante, existe também uma forma autossômica recessiva conhecida (ARPKD)
Pulmão		
Alfa-1-antitripsina	Alvéolos com defeito devido a liberação descontrolada de elastase	SERPINA1, autossômica codominante
Asma	Distúrbio inflamatório crônico das vias respiratórias	Poligênico
Fibrose cística	Muco excessivamente viscoso devido a transporte de ferro Cl-defeituoso	CFTR (regulador de membrana de condutância de fibrose cística), autossômica recessiva
Disfunção de metabolismo do tensoativo (vários tipos)	Recém-nascidos são de peso corpóreo normal, mas todos os não conseguem inflar	Transportador do cassete de ligação de ATP (ABCA3)
Discinesia ciliar primária	Muco excessivamente viscoso devido a função dos cílios defeituosa/ausente	DNAI1, CCNO, CCDC40 dentre outros

Doenças de armazenamento lisossomal		
Doença de Fabry	Além de outros, lesões na pele devido ao acúmulo de ceramida tri-hexosida	α -Galactosidase A, X-cromossômica recessiva
Doença de Gaucher Tipo-I: forma adulta (vide útil normal em tratamento) Tipo-II: forma infantil (morte antes de 1 ano de idade) Forma juvenil Tipo-III: (início de ação na primeira infância, menos grave que Tipo-II)	Acúmulo de glucocerebrosídeos (gangliosídeos, esfingolípídios)	Glucocerebrosidase, autossômica recessiva,
Síndrome de Hunter	Acúmulo de mucopolissacarídeos	L-iduronossulfato sulfatase, X-cromossômica recessiva
Síndrome de Hurler (morte aos 10 anos de idade)	Acúmulo de mucopolissacarídeos	α -L-iduronidase, autossômica recessiva
Doença de Niemann-Pick (três formas distintas A, B, C)	Defeito na liberação de Colesterol dos lisossomos, acúmulo de esfingomielina	Esfingomielinase, autossômica recessiva
Doença de Tay-Sachs (morte aos 4 anos de idade)	Acúmulo de gangliosídeo GM2 em células neuronais	Hexosaminidase A, autossômica recessiva
Pele		
Albinismo	Defeito do metabolismo de nitrogênio	Deficiência de tirosinase, autossômica recessiva
Albinismo, oculocutâneo, tipo II	Biossíntese reduzida de pigmento de melanina	OCA2, autossômica recessiva
Síndrome de Ehlers-Danlos (vários tipos)	Hérnia diagramática. comum, descolamento da retina	Vários defeitos em síntese de colágeno
Epidermólise bolhosa (vários tipos incluindo EB simplex, EB juncional, EB distrófica e síndrome de Kindler)	Defeitos em manutenção de estabilidade estrutural de queratinócito ou adesão do queratinócito à derme subjacente	Epidermólise bolhosa macular tipo (EBM), Epidermólise bolhosa 3 progressiva (EBR3), Epidermólise bolhosa 4 pseudojuncional (EBR4), Desmoplaquina (DSP), Placofilina-1 (PKP1), creatina (KRT5, KRT14), plectina (PLEC), ITGA6, subunidade de integrina (ITGB4), subunidades de laminina (LAMA3, LAMP3, LAMB3, LAMC2), colágeno (COL17A1, COL7A1 (autossômica dominante), FERMT1, autossômica recessiva
Doença de Hartnup	Defeito em captação de triptofano no trato gastrointestinal, pele sensível a luz	SLC6A19, autossômica recessiva
Telangiectasia hemorrágica hereditária, Síndrome de Osler-Weber-Rendu	Telangiectasia da pele e membranas da mucosa	Endoglin (ENG), autossômica dominante
Hipercolesterolemia, familiar	elevação de colesterol de soro ligado a lipoproteína de baixa densidade, acúmulo na pele e arteriosclerose	Receptor de lipoproteína de baixa densidade (LDLR), apolipoproteína B (APOB), autossômica dominante
Xeroderma pigmentosa	defeito na pele e melanoma devido a exposição a UV	defeito no reparo de DNA, autossômica recessiva

Calvície padrão masculina	Conversão perturbada de testosterona em di-hidrotestosterona na pele	5- α -redutase
Doenças hepáticas genéticas		
Distúrbios do metabolismo de aminoácido	Rupturas no processo multietapas que rompe a tirosina e fenilalanina do aminoácido	FAH, TAT, HPD, autossômica recessiva
Beta-talassemia intermediária	Deficiência de células de sangue vermelho maduras	HBB, autossômica recessiva
Síndrome de Crigler-Najjar	Deficiência em glucuronidação em que bilirubina fica dissolúvel em água	UGT1A1, autossômica recessiva
Distúrbios de oxidação do ácido graxo	Deficiência no processamento de ácidos graxos de cadeia longa e ácidos graxos de cadeia muito longa resultando em letargia e hipoglicemia	HADHA, ACADVL autossômica recessiva
Distúrbios do metabolismo de frutose	Gluconeogênese prejudicada causando hipoglicemia	FBP1, ALDOB, autossômica recessiva
Galactosemia	Deficiência no processamento de galactose	GALT, GALK1, GALE, autossômica recessiva
Doenças de armazenamento do glicogênio	Rompimento perturbado de glicose 6-fosfato e glicogênio leva ao acúmulo de glicogênio bem como moléculas de glicogênio anormais causando dano celular	G6PC, SLC37A4, AGL, GBE1, autossômica recessiva
Distúrbio da biossíntese do heme	Diminuição de uroporfirinogênio decarboxilase resultando em acúmulo de compostos chamados porfirinas causando níveis tóxicos no fígado	UROD autossômica dominante, ALAS2 X-ligado dominante, ALAD autossômica recessiva
Distúrbios de metabolismo (transporte) de lipídio	Deficiência de proteína funcional, que impede o movimento de colesterol e outros lipídios, levando a seu acúmulo em células	NPC1, NPC2 autossômica recessiva, LDLR, autossômica dominante
Distúrbios do metabolismo de metal	Distúrbios no armazenamento e transporte de ferro e cobre resultando em acúmulo em tecidos e órgãos	ATP7B, HAMP, HFE, HFE2, autossômica recessiva
Distúrbios de ácido orgânico (Acidúrias/Acidemias)	Ruptura perturbada de diversos blocos de construção de proteína (aminoácidos), certos lipídios, e colesterol	BCKDHA, BCKDHB, e DBT, PCCA e PCCB, MUT, MMAA, MMAB, MMADHC, MCEE, IVD, MCCC1 ou MCCC2, autossômica recessiva
Hiperoxalúria primária tipo 1	Ruptura interrompida de glioxilato levando a dano renal	AGXT, GRHPR, autossômica recessiva
Colestase intra-hepática familiar progressiva	Acúmulo de ácidos biliares em células do fígado causando dano ao fígado	ATP8B1, autossômica recessiva

Distúrbio de atividade de trombócito	Falta de atividade da enzima interrompe o equilíbrio usual entre hemorragia e coagulação	ADAMTS13, autossômica recessiva
Distúrbios do ciclo de ureia	Distúrbio do ciclo de ureia que causa uma forma de hiperamonemia	OTC (distúrbio ligados ao X), CPS1, ASS1 e SLC25A13, ASL, autossômica recessiva

Processos para Preparação

[00102] Um aspecto adicional da invenção se refere a um processo para a preparação de uma composição de acordo com o primeiro aspecto anterior, o dito processo compreendendo:

prover um nano ou micropartícula formulação de um agente terapeuticamente ativo, que é suspenso em uma fase líquida, e

adicionar pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi à fase líquida, em que a adição do aditivo crioprotetor à fase líquida pode ser realizada antes, durante ou após prover a formulação de partícula suspensa na fase líquida.

[00103] Quanto à provisão de uma formulação de partícula de um agente terapeuticamente ativo que compreende nano ou micropartículas, técnicas são estabelecidas na atualidade.

[00104] Quanto aos processos para a provisão de formulações de partícula de ácido nucleico como um agente terapêutico, preferivelmente RNA, mais preferivelmente RNA de fita única, e o mais preferivelmente mRNA, referência podem novamente ser produzidos na literatura discutida anteriormente, tal como A.C. Silva *et al.*, Current Drug Metabolism, 16, 2015, 3-16, e na literatura referida no mesmo, J.C. Kasper *et al.*, J. Contr. Rel. 151 (2011), 246-255, WO 2014/207231 e na literatura referida nos mesmos, WO 2016/097377 e na literatura referida nos mesmos, US 2017/0267631, WO 2016/081029, WO 2011/071860, WO 2016/118697, US 8450298 B2, e E.R. Lee *et al.*, Human Gene Therapy 7:1701-1717, September 10, 1996.

[00105] Formulações de partícula preferidas contendo ácido nucleico, preferivelmente RNA, mais preferivelmente RNA de fita única, e o mais preferivelmente mRNA como um agente ativo na forma de um complexo com

um polímero catiônico, oligômero, lipídio ou lipóide, tais como poliplexos, lipoplexos, lipossomos ou LNPs podem ser convenientemente formadas fazendo uso de uma automontagem de um ácido nucleico negativamente carregado com um oligômero, polímero, lipídio ou lipóide positivamente carregados.

[00106] A automontagem pode ocorrer mediante mistura das soluções dos componentes. Automontagem pode ser realizada, por exemplo, por mistura manual usando pipetagem e agitação/vortexação ou usando um dispositivo automatizado para micromistura tal como descrito, por exemplo, por Hirota *et al.* (Hirota *et al.* 1999, *Biotechniques*, 27, 286-290) ou Kasper *et al.* (Kasper *et al.* 2011, *Eur J Pharm Biopharm*, 77, 182-185) ou por focagem multifluídica tal como revisto por Xuan *et al.* (Xuan *et al.* 2010, *Microfluidics and Nanofluidics*, 9, 1-16). A fim de incorporar componentes adicionais além do ácido nucleico e o oligômero, polímero, lipídio ou lipóide a ser incorporados nas partículas da formulação de partícula, mistura sequencial pode ser usada. Nesse caso, qualquer componente adicional pode ser adicionado após a automontagem do oligômero, polímero, lipídio ou lipóide e do ácido nucleico, ou ele pode ser adicionado a qualquer um desses antes da mistura.

[00107] Por exemplo, a formação de poliplexos pode ser convenientemente obtida misturando uma solução contendo o ácido nucleico em água e uma solução contendo o polímero catiônico ou oligômero em água.

[00108] Também para a formação de lipossomos, técnicas estabelecidas são disponíveis. Elas incluem, por exemplo, a reidratação de componentes de lipídio ou lipóide, tais como películas de lipídio ou lipóide, seguido por técnicas de homogeneização como, por exemplo, ultrassonicação ou extrusão, onde exigido. Abordagens alternativas são infusão de componente de lipídio ou lipóide dissolvido em solventes orgânicos em água ou uma solução aquosa.

[00109] Como um método exemplar no qual se pode basear para a formação de nanopartículas de lipídio ou lipoplexos, o método de deslocamento de solvente pode ser mencionado.

[00110] Partículas que se baseiam em um vetor viral podem ser fornecidas por métodos biológicos conhecidos.

[00111] Como exemplos adicionais para a preparação de uma formulação de partícula, as partículas compreendendo um agente terapeuticamente ativo podem ser formadas por emulsificação de uma solução contendo o agente ativo, opcionalmente em combinação com um agente de formação de matriz, seguido por solidificação das partículas. A solidificação pode ser realizada, por exemplo, removendo um solvente de uma fase óleo emulsificada em que um material de formação de matriz é contido, ou reticulando ou polimerizando componentes para a formação de uma matriz. Também os materiais e métodos para a formação de formulações lipossomais são conhecidos pelos versados na técnica.

[00112] O aditivo crioprotetor pode ser convenientemente adicionado à fase líquida na qual a formulação de nano ou micropartícula é suspensa ou na qual a suspensão deve ser provida. Em outras palavras, a adição do aditivo crioprotetor à fase líquida pode ser realizada antes, durante ou após prover a formulação de partícula suspensa na fase líquida.

[00113] A composição sólida de acordo com o segundo aspecto da presente invenção pode ser preparada por um processo, compreendendo:

uma primeira etapa de preparar uma composição de acordo com o primeiro aspecto anterior por um processo compreendendo

prover uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e

adicionar pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi à fase líquida, em que a adição do aditivo crioprotetor à fase líquida pode ser realizada antes,

durante ou após prover a formulação de partícula suspensa na fase líquida, e uma segunda etapa de congelar a composição obtida na primeira etapa.

[00114] Quanto à primeira etapa, deve-se entender que a informação que é provida anteriormente em relação à preparação da composição em suspensão igualmente se aplica para a preparação da composição sólida.

[00115] A etapa de congelamento como uma segunda etapa é tipicamente realizada submetendo a composição em suspensão a temperaturas suficientemente baixas (por exemplo, -10°C ou menos, preferivelmente -20°C ou menos) em um recipiente adequado. Como um meio de resfriamento, por exemplo, ar frio ou líquidos frios podem ser usados.

[00116] Incidentalmente, como explicado anteriormente, a composição sólida de acordo com o segundo aspecto da invenção é uma composição que permite que uma formulação de partícula de um agente terapeuticamente ativo contendo nanopartículas ou micropartículas seja armazenada. Neste ponto, deve-se entender que uma composição em suspensão de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode também ser recuperada da composição sólida de acordo com o segundo aspecto da invenção por descongelamento da composição sólida.

[00117] Assim, como um aspecto adicional, a presente invenção também provê um processo para a preparação de uma composição de acordo com o primeiro aspecto anterior, o dito processo compreendendo:

uma primeira etapa de preparar uma composição de acordo com o primeiro aspecto anterior por um processo compreendendo

prover uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e

adicionar pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos $\text{C}_3\text{-C}_5$ substituídos com um ou dois grupos hidróxi à fase líquida, em que a adição do aditivo crioprotetor à fase líquida pode ser realizada antes,

durante ou após prover a formulação de partícula suspensa na fase líquida, uma segunda etapa de congelar a composição obtida na primeira etapa, e uma terceira etapa de descongelar a composição congelada obtida na segunda etapa.

Métodos e usos

[00118] Além disso, a invenção provê um método para preservar uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo, método este em que compreende prover uma composição de acordo com o primeiro aspecto anterior da invenção, isto é, uma composição compreendendo:

uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi, e congelar a composição.

[00119] Também em relação a esse aspecto da invenção, a informação provida anteriormente a respeito das modalidades adequadas e preferidas do agente terapêutico, de sua formulação de partícula, do aditivo crioprotetor, na fase líquida, nos processos disponíveis para prover a composição, e na etapa de congelamento, continua a se aplicar.

[00120] Como será entendido pelos versados na técnica, o termo “preservação” indica nesse contexto que as características terapêuticas relevantes da formulação de partícula do agente terapeuticamente ativo são retidas a um grau substancial, preferivelmente totalmente retidas, durante seu armazenamento. O método para preservar a formulação de partícula tipicamente envolve adicionalmente o armazenamento da composição congelada retendo-as ao mesmo tempo em seu estado congelado por um período de tempo desejado, por exemplo, por diversas horas, dias, semanas,

meses ou mesmo anos.

[00121] Ainda como um outro aspecto, a invenção provê o uso de um composto selecionado de alcanos C_3 - C_5 substituídos com um ou dois grupos hidróxi como um aditivo crioprotetor para uma composição compreendendo uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo.

[00122] Também em relação a esse aspecto da invenção, a informação provida anteriormente a respeito das modalidades adequadas e preferidas do agente terapêutico, de sua formulação de partícula, e do aditivo crioprotetor continua a se aplicar.

[00123] Como será percebido, o uso como um aditivo crioprotetor envolve a combinação do composto selecionado de alcanos C_3 - C_5 substituídos com um ou dois grupos hidróxi com a formulação de partícula de um agente terapeuticamente ativo, em uma composição. A composição na qual os dois componentes são combinados é a composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção. O uso envolve adicionalmente congelamento da composição, de modo que o composto selecionado de alcanos C_3 - C_5 substituídos com um ou dois grupos hidróxi pode agir como um crioprotetor, isto é, ele pode proteger as partículas da composição de partícula e pode assegurar em particular que sua funcionalidade para aplicação ao ou por meio do trato respiratório seja mantida a um grau significativo, preferivelmente totalmente mantida.

[00124] Um sumário de aspectos importantes da invenção é provido nos itens seguintes. Deve-se entender que esses itens formam uma parte da descrição geral da presente invenção, de maneira tal que a informação provida na parte anterior da especificação, por exemplo, em relação às modalidades preferidas adicionais ou recursos opcionais, também se aplica aos itens seguintes.

[00125] Uma composição compreendendo:

uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e

pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi.

[00126] A composição de acordo com o item 1, em que o agente terapeuticamente ativo é um ácido nucleico.

[00127] A composição de acordo com o item 2, em que o ácido nucleico é RNA.

[00128] A composição de acordo com o item 3, em que o RNA é mRNA.

[00129] A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 4, em que a formulação de nano ou micropartícula mostra um diâmetro de partícula médio na faixa de 1 a 4.000 nm, mais preferivelmente 2 a 2.500 nm, e o mais preferivelmente 5 a 1.000 nm.

[00130] A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 5, em que as partículas na formulação de nano ou micropartícula têm um diâmetro de partícula máximo de 20 µm, mais preferivelmente 10 µm, e o mais preferivelmente 5 µm.

[00131] A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 6, em que a formulação de nano ou micropartícula tem uma carga ativa, expressa como o peso do agente terapeuticamente ativo para o peso total das partículas na formulação de partícula, na faixa de 0,1 a 95%, mais preferivelmente 0,5 a 90%, o mais preferivelmente 1 a 80%.

[00132] A composição de acordo com qualquer um dos itens 2 a 7, em que o agente terapeuticamente ativo é um ácido nucleico e as partículas da formulação de nano ou micropartícula compreendem o ácido nucleico e um excipiente catiônico.

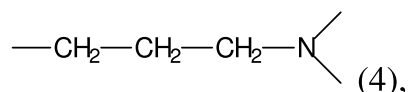
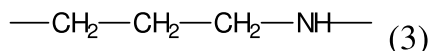
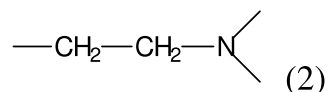
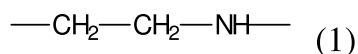
[00133] A composição de acordo com o item 8, em que as partículas da formulação de partícula compreendem o ácido nucleico na forma de um

complexo formado pelo ácido nucleico e um oligômero catiônico ou um polímero catiônico como o excipiente catiônico.

[00134] A composição de acordo com o item 9, em que o complexo é formado pelo ácido nucleico e um oligômero ou polímero catiônico compreendendo uma pluralidade de unidades em que um grupo amino é contido.

[00135] A composição de acordo com o item 10, em que a razão de N/P do número de amina átomos de nitrogênio N no oligômero ou polímero catiônico para o número de grupos fosfato P no ácido nucleico é na faixa de 1 a 100, mais preferivelmente 2 a 80, e o mais preferivelmente 3 a 60.

[00136] A composição de acordo com o item 10 ou 11, em que o polímero catiônico compreende uma pluralidade de unidades independentemente selecionadas do seguinte (1), (2), (3) e (4):



e em que um ou mais dos átomos de nitrogênio das unidades de repetição (1), (2), (3) e/ou (4) podem ser protonados para prover a carga catiônica do polímero.

[00137] 13. A composição de acordo com o item 8, em que as partículas da formulação de partícula compreendem o ácido nucleico na forma de um complexo formado pelo ácido nucleico e um lipídio catiônico ou um lipoide catiônico como o excipiente catiônico.

[00138] 14. A composição de acordo com o item 13, em que partículas da formulação de partícula compreendem lipoplexos, lipossomos, ou nanopartículas de lipídio.

[00139] 15. A composição do item 13 ou 14, em que as partículas da formulação de partícula compreendem adicionalmente um ou mais lipídios auxiliares selecionado de esteróis, lipídios neutros, esfingolipídios e lipídios peguillados.

[00140] 16. A composição de qualquer um dos itens 13 a 15, em que a razão em peso total de lipídios e lipoides para o peso do ácido nucleico é na faixa de 0,1 a 200, mais preferivelmente 0,2 a 150, o mais preferivelmente 0,5 a 100.

[00141] 17. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 16, em que o aditivo crioprotetor compreende pelo menos um grupo hidróxi secundário.

[00142] 18. A composição de acordo com o item 17, em que o aditivo crioprotetor é selecionado de 1,2-propanodiol, 2-propanol, 1,2-butanodiol, e 1,3-butanodiol.

[00143] 19. A composição de acordo com o item 17, em que o aditivo crioprotetor é 1,2-propanodiol.

[00144] 20. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 19, em que o aditivo crioprotetor é contido a uma concentração de 0,5 a 50% em p/v, mais preferivelmente 1 a 40% em p/v, e o mais preferivelmente 1 a 30% em p/v, com base no volume da fase líquida.

[00145] 21. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 20, que compreende as partículas da formulação de nano ou micropartícula em uma quantidade de maneira a prover agente terapeuticamente ativo, que é contido na formulação de partícula, a uma concentração de 0,01 a 50 mg/ml, mais preferivelmente 0,02 a 30 mg/ml, com base no volume total da composição.

[00146] 22. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 21, em que água e o aditivo crioprotetor são os únicos solventes contidos na fase líquida.

- [00147] 23. Uma composição sólida compreendendo:
uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo, e
pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi,
que é obtenível congelando a composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 22.
- [00148] 24. Um processo para a preparação de uma composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 22, o dito processo compreendendo:
prover uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e
adicionar pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi à fase líquida, em que a adição do aditivo crioprotetor à fase líquida pode ser realizada antes, durante ou após prover a formulação de partícula suspensa na fase líquida.
- [00149] 25. Um processo para a preparação da composição sólida de acordo com o item 23, o dito processo compreendendo:
uma primeira etapa de preparar uma composição de acordo com o primeiro aspecto anterior por um processo compreendendo:
prover uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e
adicionar pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi à fase líquida, em que a adição do aditivo crioprotetor à fase líquida pode ser realizada antes, durante ou após prover a formulação de partícula suspensa na fase líquida,
e uma segunda etapa de congelar a composição obtida na primeira etapa.
- [00150] 26. Um método para preservar uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo, o dito método

compreendendo prover uma composição em suspensão de acordo com qualquer um dos itens 1 a 22, e congelar a composição.

[00151] 27. Uso de um composto selecionado de alcanos C_3 - C_5 substituídos com um ou dois grupos hidróxi como um aditivo crioprotetor para uma composição compreendendo uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo.

[00152] 28. Um dispositivo para formar um aerossol a partir de uma composição de particulado suspensa em um líquido ou para nebulizar uma composição como essa, dispositivo este que compreende a composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 22.

[00153] 29. O dispositivo de acordo com o item 28, em que o dispositivo é um inalador selecionado de um inalador de dose medida, um nebulizador, e um dispositivo de pulverização nasal.

[00154] 30. Um método de tratamento, compreendendo administrar a composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 22 a um paciente, preferivelmente por meio de administração ao ou por meio do trato respiratório, mais preferivelmente por meio de administração pulmonar ou administração nasal.

[00155] 31. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 22 para uso no tratamento ou prevenção de uma doença, em que a composição deve ser administrada ao ou por meio do trato respiratório.

[00156] 32. A composição para uso de acordo com o item 31, em que a composição deve ser administrada por meio de administração pulmonar ou por meio de administração nasal.

[00157] 33. A composição de acordo com o item 31 ou 32, em que o agente terapeuticamente ativo é RNA, mais preferivelmente mRNA, para uso no tratamento ou prevenção de uma doença por meio de uma terapia baseada em RNA.

[00158] 34. A composição para uso de acordo com qualquer um dos

itens 31 a 33, em que a doença a ser tratada ou prevenida é uma doença pulmonar.

Exemplos

Abreviações

<u>Abreviação</u>	<u>Descrição</u>
RT	Temperatura ambiente
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
brPEI	Ramificados polietilenoimina
FLuc	Luciferase de vagalume
w/o	sem
cmRNA	Ácido ribonucleico quimicamente modificado
FLuc	Luciferase de vagalume
PG	1,2-propanodiol, propileno glicol
N/P	Razão de carreador de nitrogênio de amina para fosfato em mRNA

Exemplo I: Classificação de diferentes classes de moléculas como aditivos crioprotetores para formulações de nano ou micropartícula

Formação do complexo

[00159] Complexos de poli(etilenimina) ramificada (brPEI) e mRNA que codifica para luciferase foram formados a uma concentração final de 0,25 mg/mL. Em um processo de mistura padrão, mRNA foi diluído com água a uma concentração de 0,5 mg/mL. O mesmo volume de solução de brPEI foi preparado a uma concentração de 0,65 mg/mL em água. Nano ou micropartículas foram formadas por injeção da solução de mRNA na solução de brPEI seguido por mistura usando uma pipeta eletrônica (Mettler-Toledo, E4 LTS 1.000 µL). Após a mistura, os complexos foram incubados por 20 min em gelo antes do uso.

Medição de tamanho

[00160] Para a determinação do diâmetro de partícula, 100 µL de uma suspensão das partículas foram cheios em uma cubeta (Brand, UV-cuvette Micro) e medidos usando um Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments) dando os diâmetros hidrodinâmicos e o diâmetro hidrodinâmico médio (média z) em nm. Como um meio de suspensão, água ou água contendo um aditivo crioprotetor, como indicado, foi usada.

Desafio de congelamento e descongelamento

[00161] A formulação foi diluída 1:2 com soluções de aditivo 2X (20/10/2%) (Tabela 1) e dividida em duplicatas. Uma amostra de cada formulação resultante foi usada para determinação do tamanho (Malvern Zetasizer NanoZS) na presença de aditivo. As demais amostras foram congeladas a -20°C por 16 h, descongeladas à RT e imediatamente armazenadas no gelo antes de as soluções atingirem RT. Cada formulação descongelada foi então usada para determinação do tamanho (Malvern Zetasizer NanoZS) e comparada quanto ao% de desvio de tamanho de formulações antes de congelamento e após descongelamento de acordo com a equação seguinte, em que d_h indica o diâmetro de partícula médio z:

$$\text{desvio de tamanho [\%]} = \left(\frac{d_h \text{ (após congelamento)}}{d_h \text{ (antes do congelamento)}} - 1 \right) * 100 \%$$

Transfecção e ensaio da atividade de luciferase

[00162] Células A549 foram cultivadas em meio MEM suplementado com soro bovino fetal 10% (FBS) e penicilina/estreptomicina 1% (P/S) a 37°C, CO₂ 5%. Células foram semeadas a 20.000 células/poço em 100 µL de meio em uma placa de 96 poços 24 h antes da transfecção. No dia de transfecção o meio foi substituído com MEM sem FBS e penicilina/estreptomicina seguido por adição de mRNA complexado em 60 µL/poço em duplicatas. 4 h após a transfecção, o meio foi substituído com MEM com FBS 10% e p/S 1%. As placas foram incubadas por 24 h a 37°C e CO₂5%. Após 24 h de incubação, o meio foi removido e células foram lisadas em 100 µL de tampão de lise (Tris HCl 25 mM, TritonX-100 0,1%, pH 7,8) e incubadas em um agitador de placa por 30 min a 600 rpm. Em seguida, 50 µL de lisato celular de cada poço foram transferidos para uma placa de 96 poços e a atividade de luciferase de vagalume repórter foi medida por intensidade de bioluminescência em um Tecan Infinite 200 PRO após adição de tampão de Luciferina (D-Luciferina 0,47 mM, Coenzima A 0,27 mM, DTT 3,33 mM, ATP 0,53 mM, MgCO₃ 1,1 mM, MgSO₄ 2,7 mM, Tricina 20 mM, EDTA 0,1

mM).

Preparação de amostra para experimentos in vivo

[00163] Complexos foram preparados como descrito em “formação de complexo” e “desafio de congelamento-descongelamento” com a modificação seguinte. 4 mL de solução complexa foram preparados a uma concentração de mRNA de 0,5 mg/mL e diluídos 1:2 com uma dupla solução de aditivo concentrada para resultar em uma concentração de mRNA final de 0,25 mg/mL (8 mL). Amostras foram mantidas congeladas até a nebulização nos animais.

Nebulização

[00164] Animais foram colocados em um Câmara de Dosagem de Massa de Pequeno Tamanho Buxco (Data Sciences International, Alemanha). As formulações foram descongeladas à RT, colocadas em gelo moído antes de atingir RT e então nebulizadas usando um Nebulizador Aeroneb Solo (Aeroneb, Alemanha) a uma taxa de circulação de ar de 3 L/min e um ciclo de trabalho de 100%.

Medição de bioluminescência em pulmões explantados

[00165] 24 h após a aplicação, os animais foram colocados sob anestesia total através de injeção intraperitoneal de Fentanil/Midazolam/Medetomidina (0,05/5,0/0,5 mg/kg BW). 50 µL de D-Luciferina (30 mg/mL dissolvidos em salina tamponada com fosfato, pH 7) foram aplicados por meio da via de aspiração (inalação de solução após ela ter sido diretamente aplicada às narinas) e 100 µL de D-Luciferina foram aplicados sistemicamente por injeção intraperitoneal. Em 10 min após administração de Luciferina, os camundongos foram eutanizados por meio de luxação cervical. Após perfusão com PBS por meio do coração direito os pulmões foram explantados. A bioluminescência foi medida usando um Xenogen IVIS Luminar XR (Caliper LifeSciences) com uma classificação definida em 8 e um tempo de exposição de 5 min. A bioluminescência foi

quantificada e analisada usando Software Living Image 4.4 (Xenogen). Em caso de imagens sobressaturadas (detecção de expressão fora da faixa linear), o tempo de exposição foi reduzido para 1 min. A bioluminescência foi medida como fluxo total por órgão (em fótons/s). Apenas imagens sem sobressaturação foram usadas para análise. Os pulmões foram congelados rapidamente e armazenados a -80°C.

Atividade de luciferase em pulmões homogeneizados

[00166] Órgãos descongelados foram pesados e uma metade dos pulmões explantados foi homogeneizada em tampão de lise usando um Homogeneizador FastPrep^o-24 (MP Biomedicals). 100 µL de tampão de Luciferina foram adicionados automaticamente pelo Lumat LB 9507 Luminometer (Berthold Technologies) a 75 µL de lisatos centrifugados. A atividade de luciferase foi medida em RLU/s e convertida em RLU/órgão.

Resultados

[00167] A capacidade de prevenir agregação de partícula de formulações de polímero/mRNA após um ciclo de congelamento-descongelamento foi mostrada para diferentes tipos de aditivos, incluindo compostos estabelecidos como aditivos crioprotetores na técnica. A composição usando 1,2-propanodiol é uma composição de acordo com a invenção, as outras composições são composições de referência. Diâmetro hidrodinâmico de partículas foi avaliado antes de congelamento. Após 16 h a -20°C, as formulações foram descongeladas e o diâmetro hidrodinâmico de partícula foi medido novamente. Diferenças de tamanho entre partículas antes de congelamento e após descongelamento são exibidas na Tabela 1b. Números altos indicam um aumento enorme em tamanho e assim a agregação. Tabela 1a: Tamanho padrão de um complexo recém-preparado em água medido com o ZetaSizer Nano ZS (Malvern)

Carreador		Diâmetro hidrodinâmico (média z [nm])
brPEI, N/P 10		122,6

Tabela 1b: Desvio de tamanho de partícula após um ciclo de congelamento-

descongelamento comparado aos complexos frescos em diferentes tipos e concentrações de aditivos.

[00168] Desafio de congelamento-descongelamento (-20°C) de formulações de brPEI 25kDa/mRNA N/P 10 a 0,25 mg/mL de concentração de mRNA contendo a% (p/v) de aditivo indicado. Mono-hidrato de α -Lactose e D-Manitol foram testados a concentrações reduzidas devido a solubilidade limitada em água. Cloreto de sódio foi testado a concentrações reduzidas para permanecer na faixa de concentração isotônica. n = 1.

Classe	Aditivo	Concentração de aditivo [% em p/v]	Diferença de tamanho [%]
n/a	sem	0	1.121
Dissacarídeos	Di-hidrato de D-(+)-trealose *	10	-6
		5	3
		1	659
		10	-10
	Sacarose*	5	0
		1	1.608
		2,5	14
	Mono-hidrato de α -Lactose *	1	17
		0,25	1.059
Oligossacarídeos	Dextrano de Leconostoc spp.*	10	-48
		5	52
		1	469
	(2-Hidroxipropil)- β -ciclo-dextrina*	10	12
		5	30
		1	135
Alcanóis	Glicerol*	10	2
		5	-5
		1	836
	1,2-Propanodiol	10	3
		5	10
		1	28
	D-Manitol*	2,5	45
		1	210
		0,25	947
Polímeros	Polivinilpirrolidona*	10	-35
		5	2
		1	190
	PEG nominal Mp 1,5k*	10	211
		5	356
		1	724
	PEG nominal Mp 4k*	10	75
		5	230
		1	980
	PEG nominal Mp 10k*	10	40
		5	86
		1	1.234
	PEG nominal Mp 20k*	10	300
		5	464
		1	1.677

	Tween® 20*	10	13
		5	35
		1	842
	Tween® 80*	10	32
		5	18
		1	192
Sal	Cloreto de sódio*	1,35	1.451
		0,9	4.194
		0,45	1.709

*composição de referência

Tabela 2: razões em peso de mRNA/polímero/1,2-propanodiol do experimento anterior.

% em p/v de 1,2-propanodiol	mRNA [mg]	Polímero [mg]	1,2-Propanodiol [mg]
1	1	1,3	41,6
5	1	1,3	208,0
10	1	1,3	416,0

[00169] Um aumento de tamanho de mais que 100% (100% $\triangleq$ diâmetro dobrado) foi definido como processo de agregação. Aditivos resultando em uma diferença de tamanho abaixo desse limiar foram selecionados para ser testados in vitro quanto a eficiência de transfecção em células A549 após um ciclo de congelamento-descongelamento (Figura 1 e Tabela 3). Açúcares não foram testados in vitro.

[00170] A Figura 1 mostra a eficiência de transfecção de formulações de brPEI/FLuc mRNA N/P 10 contendo aditivos em células A549.

Tabela 3: Dados tabulados da Figura 1.

			Dose [μ g mRNA/poço]		
	Aditivo		0,125	0,25	0,5
	Tipo	Conc. [% em p/v]	RLU [cps]		
brPEI 25kDa/FLuc, N/P10	complexo fresco*	0	11 $\pm$ 0,5	76 $\pm$ 29,5	698 $\pm$ 364,5
	Polissorbato-80*	5	10 $\pm$ 2,5	85 $\pm$ 16,5	875 $\pm$ 405,5
	Polivinilpirrolidona*	5	14 $\pm$ 1,5	60 $\pm$ 24,0	336 $\pm$ 121,0
	PEG nominal Mp 4k*	10	17 $\pm$ 1,0	58 $\pm$ 5,5	365 $\pm$ 69,5
	(2-Hidroxipropil)- β -ciclodextrina*	5	11 $\pm$ 3,5	44 $\pm$ 9,5	332 $\pm$ 12,5
	Glicerol*	5	17 $\pm$ 2,0	31 $\pm$ 6,0	204 $\pm$ 64,0
	PEG nominal Mp 10k*	10	9 $\pm$ 3,0	19 $\pm$ 8,0	205 $\pm$ 33,0
	D-Manitol*	5	20 $\pm$ 7,5	22 $\pm$ 9,0	179 $\pm$ 5,5
	1,2-Propanodiol	5	8 $\pm$ 6,5	15 $\pm$ 3,5	3,5

*composição de referência

[00171] A partir dos dados tabulados, pode-se ver que todos os aditivos retiveram a eficiência de transfecção e foram assim selecionados para ser testados por nebulização em camundongos. 8 mL de solução complexa

contendo 2 mg de mRNA que codifica para luciferase de vagalume foram nebulizados em um grupo de camundongos Balb/c (n = 3). 24 h após o tratamento os camundongos foram eutanizados. A eficiência de distribuição de mRNA foi analisada por meio de quantificação de atividade de luciferase nos órgãos excisados (por Ivis) bem como no homogenato de órgão (vide Figura 2 e Tabela 4). As razões em peso de mRNA/polímero/1,2-propanodiol empregadas são reportadas na Tabela 5.

[00172] A Figura 2 mostra a eficiência de transfecção *in vivo* de formulações de brPEI/mRNA aplicadas por meio de nebulização após um ciclo de congelamento-descongelamento.

[00173] 2 mg de FLuc mRNA complexado com brPEI 25kDa a N/P 10 e 0,25 mg/mL foram nebulizados em camundongos após um ciclo de congelamento-descongelamento na presença dos aditivos indicados. Para referência, um grupo foi tratado com partículas recém preparadas sem adição de aditivos. Alta viscosidade de formulações contendo pEG4k ou PEG10k 10% preveniu nebulização pelo nebulizador Aeroneb. n = 3.

Tabela 4: Dados tabulados da Figura 2 incluindo dados de bioluminescência.

Aditivo		Bioluminescência (pulmões explantados)		Atividade de luciferase (homogenatos)	
Tipo	Conc. [% em p/v]	Fluxo Total [fóton/s]	STDEV	[RLU/órgão]	STDEV
nenhum (complexo fresco)*	0	113.600	90.026	11.745	5.284
1,2-Propanodiol	5	134.100	65.699	11.168	5.372
(2-Hidroxipropil)- β -ciclo-dextrina*	5	20.110	9.911	2.347	1.292
D-Manitol*	5	11.760	4.135	977	453
Polissorbato- 80*	5	16.117	11.444	1.075	919
Glicerol*	5	7.610	624	719	80
Polivinilpirrolidona*	5	7.463	2.292	369	180
PEG nominal Mp 4k*	10	não nebulizável			
PEG nominal Mp 10k*	10	não nebulizável			
Trealose*	5	10.140	3.675	978	172
Sacarose*	5	8.922	838	716	78
Lactose*	5	5.792	1.770	338	46

*composição de referência

Tabela 5: Razões em peso de mRNA/polímero/1,2-propanodiol do experimento anterior.

% em p/v de 1,2-Propanodiol	mRNA [mg]	Polímero [mg]	1,2-Propanodiol [mg]
5	1	1.3	208,0

Discussão e Conclusão

[00174] 1,2-Propanodiol (propileno glicol, PG) foi identificado como aditivo que previne agregação de partícula e mantém a eficiência de transfecção de formulações após a nebulização *in vivo* seguindo um ciclo de congelamento-descongelamento comparado a nano ou micropartículas de brPEI/mRNA recém formuladas.

Exemplo II: Comparação de diferentes aditivos estruturalmente relacionados a 1,2-propanodiol como crioprotetores para nano ou micropartículas

Formação de complexo

[00175] Complexos de poli(etilenimina) ramificada (brPEI) e mRNA que codifica para luciferase foram formados a uma concentração final de 0,25 mg/mL. Em um processo de mistura padrão, mRNA foi diluído com água a uma concentração de 0,5 mg/mL. O mesmo volume de solução de brPEI foi preparado a uma concentração de 0,65 mg/mL em água. Nanopartículas foram formadas por injeção da solução de mRNA na solução de brPEI seguido por mistura usando uma pipeta eletrônica (Mettler-Toledo, E4 LTS 1.000 µL). Após a mistura, os complexos foram incubados por 20 min no gelo antes do uso.

Medição de tamanho

[00176] Para a determinação do diâmetro de partícula, 100 µL de uma suspensão das partículas foram cheios em uma cubeta (Brand, UV-cuvette Micro) e medidos usando um Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments) dando os diâmetros hidrodinâmicos e o diâmetro hidrodinâmico médio (média z) em nm. Como um meio de suspensão, água ou água contendo um aditivo crioprotetor, como indicado, foi usada.

Desafio de congelamento-descongelamento

[00177] A formulação foi diluída 1:2 com soluções de aditivo 2X

(20/10/2%) (Tabela 6) e dividida em duplicatas. Como a solubilidade de alguns aditivos foi limitada, as substâncias seguintes foram testadas a concentrações reduzidas (vide Tabela 6): 2-metil-1,4-butanodiol, pentaeritritol. Uma amostra de cada formulação resultante foi usada para determinação do tamanho (Malvern Zetasizer NanoZS) na presença de aditivo. As demais amostras foram congeladas a -20°C por 16 h, descongeladas à RT e imediatamente armazenadas no gelo antes de as soluções atingirem RT. Uma amostra de cada formulação descongelada foi então usada para determinação do tamanho (Malvern Zetasizer NanoZS) e comparada quanto ao% de desvio de tamanho de formulações antes de congelamento e após descongelamento de acordo com a equação seguinte, em que d_h indica o diâmetro de partícula médio z:

$$\text{desvio de tamanho [\%]} = \left(\frac{d_h \text{ (após congelamento)}}{d_h \text{ (antes do congelamento)}} - 1 \right) * 100 \%$$

Preparação de amostra para experimentos in vivo

[00178] Complexos foram preparados como descrito em “formação de complexo” e “desafio de congelamento-descongelamento” com a modificação seguinte. 4 mL de solução de complexo foram preparados a uma concentração de 0,5 mg/mL e diluídos 1:2 com uma dupla solução de aditivo concentrada para resultar em uma concentração de mRNA final de 0,25 mg/mL (8mL). As amostras foram mantidas congeladas até a nebulização nos animais.

Nebulização

[00179] Animais foram colocados em uma Câmara de Dosagem de Massa de Tamanho Pequeno Buxco (Data Sciences International, Alemanha). As formulações foram descongeladas à RT, colocadas em gelo moído antes de atingir RT e então nebulizadas usando um Nebulizador Aeroneb Solo (Aeroneb, Alemanha) a uma taxa de circulação de ar de 3 L/min e um ciclo de trabalho de 100%.

Medição de bioluminescência em pulmões explantados

[00180] 24 h após a aplicação, os animais foram colocados sob anestesia total através de injeção intraperitoneal de Fentanil/Midazolam/Medetomidina (0,05/5,0/0,5 mg/kg BW). 50 µL de D-Luciferina (30 mg/mL dissolvidos em salina tamponada com fosfato, pH 7) foram aplicados por meio da via de aspiração (inalação de solução após ela ter sido diretamente aplicada às narinas) e 100 µL de D-Luciferina foram aplicados sistemicamente por injeção intraperitoneal. Em 10 min após administração de Luciferina, os camundongos foram eutanizados por meio de luxação cervical. Após perfusão com PBS por meio do coração direito os pulmões foram explantados. A bioluminescência foi medida usando um Xenogen IVIS Luminar XR (Caliper LifeSciences) com uma classificação definida em 8 e um tempo de exposição de 5 min. A bioluminescência foi quantificada e analisada usando Software Living Image 4.4 (Xenogen). Em caso de imagens sobressaturadas (detecção de expressão fora da faixa linear), o tempo de exposição foi reduzido para 1 min. A bioluminescência foi medida como fluxo total por órgão (em fótons/s). Apenas imagens sem sobressaturação foram usadas para análise. Os pulmões foram congelados rapidamente e armazenados a -80°C.

Atividade de luciferase em pulmões homogeneizados

[00181] Órgãos foram pesados e metade dos pulmões explantados foi homogeneizada em tampão de lise usando um Homogeneizador FastPrep^o-24 (MP Biomedicals). 100 µL de tampão de Luciferina foram adicionados automaticamente pelo Lumat LB 9507 Luminometer (Berthold Technologies) a 75 µL de lisatos centrifugados. A atividade de luciferase foi medida em RLU/s e convertida em RLU/órgão.

Resultados

[00182] Exemplo I mostra que 1,2-propanodiol previne agregação de nano ou micropartícula durante o congelamento mantendo ao mesmo tempo a atividade *in vivo* enquanto glicerol (uma molécula com similaridade química)

previne agregação durante o congelamento sem manter a atividade *in vivo*. Os resultados desse teste mostram que alcanóis C₃-C₅ e alcanodióis estruturalmente relacionados a 1,2-propanodiol são capazes de prevenir agregação durante um desafio de congelamento-descongelamento e manter a eficiência de transfecção após a nebulização subsequente. Os complexos foram formados e misturados com as soluções de aditivo (em água) para resultar nas concentrações de aditivo finais listadas na Tabela 6.

[00183] O diâmetro hidrodinâmico de partículas foi medido antes de congelamento a -20°C. Após 16 h, todas as formulações foram descongeladas e tamanho de partícula medido novamente. A% de desvio de tamanho antes de congelamento versus após descongelamento é exibida na Tabela 6b. Números altos indicam um grande aumento em tamanho e assim a agregação. Tabela 6a: Tamanho padrão de um complexo recém-preparado em água.

Medição em triplicada com o ZetaSizer Nano ZS (Malvern)

Carreador	Diâmetro hidrodinâmico (média z [nm])	PdI
brPEI, N/P 10	70,94	0,204
	66,30	0,193
	65,40	0,191

Tabela 6b: % de desvio de tamanho antes de congelamento versus após descongelamento das concentrações de aditivo testadas.

[00184] 2-Metil-1,4-butanodiol e Pentaeritritol foram testados a concentrações reduzidas devido a solubilidade limitada em água. n = 1.

Formulação	Aditivo	Concentração de aditivo [% em p/v]	Diferença de tamanho [%]
brPEI/mRNA N/P10 0,25 mg/mL	nenhum*	0	1.115
		0	1.766
		0	945
	2-Propanol	10	47
		5	60
		1	120
	1,2-Propanodiol	10	1
		5	7
		1	38
	1,2-Butanodiol	10	0
		5	11
		1	50
	1,3-Butanodiol	10	1
		5	16
		1	41
	2-Metil-1,4-butanodiol	1,25	33

		0,625	77
		0,125	1.285
	1,1,1-Tris(hidroxilmetil)etano*	10	510
		5	353
		1	690
	Pentaeritritol*	5	316
		2,5	323
		0,5	609
	1,1,1-Tris(hidroxilmetil)propano*	10	1
		5	13
		1	41
	Tetraglicol*	10	17
		5	34
		1	90
	Glicerol formal*	10	13
		5	17
		1	67
	Trietileno glicol*	10	3
		5	20
		1	32
	Glicerol*	10	12
		5	8
		1	46

*exemplos de referência

[00185] Uma mudança no tamanho de partícula de mais que 100% (100% $\triangleq$ diâmetro dobrado) foi definido como um processo de agregação. Aditivos resultando em um% de desvio de tamanho abaixo desse limiar foram selecionados para ser testados por nebulização em camundongos (Figura 3 e Tabela 7).

[00186] A Figura 3 mostra a eficiência de transfecção *in vivo* de formulações de brPEI/mRNA após um ciclo de congelamento-descongelamento.

[00187] 2 mg/8 mL de FLuc mRNA complexado com brPEI 25kDa a N/P 10 e 0,25 mg/mL foram nebulizados em camundongos após um ciclo de congelamento-descongelamento na presença dos aditivos indicados. 24 h após o tratamento os camundongos foram anestesiados, os pulmões explantados, homogeneizados e medidos para atividade de luciferase. n = 3.

Tabela 7: Dados tabulados da Figura 3 incluindo dados de bioluminescência.

Aditivo		Bioluminescência (pulmões explantados)		Atividade de luciferase (homogenatos)	
Tipo	Conc. [% em p/v]	Fluxo Total [fóton/s]	STDEV	[RLU/órgão]	STDEV
nenhum (complexo fresco)*	0	113.600	90.026	11.745	5.284
1,2-Propanodiol	5	168.833	87.083	22.457	9.895

2-Propanol	10	208.173	93.362	17.680	3.807
1,2-Butanodiol	5	77.080	27.417	9.475	5.724
1,3-Butanodiol	5	65.000	39.251	7.508	2.858
2-Metil-1,4-butanodiol	0,625	58.187	21.887	5.465	2.697
Glicerol formal*	5	19.097	14.362	1.137	1.040
Tetraglicol*	5	10.407	880	267	112
1,1,1-Tris(hidroximetil)propano*	5	38.467	30.234	266	163
Trietileno glicol*	5	17.833	3.734	245	102

*exemplos de referência

Discussão e Conclusão

[00188] Nesse estudo, pôde ser demonstrado que alcanóis/alcanodióis estruturalmente relacionados a 1,2-propanodiol têm a capacidade de manter a eficiência de transfecção do complexo após a nebulização em pulmões de murino após um ciclo de congelamento-descongelamento. As propriedades biofísicas foram analisadas primeiro antes de congelamento e após um ciclo de congelamento-descongelamento uma vez que agregação ou rompimento de partículas leva a formulações não funcionais. As descobertas do exemplo I podem ser replicadas já que 1,2-propanodiol e glicerol preservam o tamanho de partícula. Como já demonstrado no estudo anterior, preservação de tamanho de partícula não resultou automaticamente em partículas funcionais após a nebulização em camundongos.

Exemplo III: Formulações de congelamento em várias concentrações de mRNA e/ou várias razões de N/P

Formação de complexo

[00189] Complexos de (polietilenimina) (brPEI) ramificada, P7 (polietilenimina-co-propilenimina(linear), MW: 20 kDa) ou P12 (polietilenimina-co-propilenimina) linear, MW: 24 kDa) com mRNA que codifica para luciferase foram formados a uma concentração de 0,25 mg/mL. Em um processo de mistura padrão, mRNA foi diluído em uma concentração de 0,5 mg/mL em água. O mesmo volume de solução de polímero foi preparado a uma concentração de 0,65 mg/mL em água. Para formular as nanopartículas, a solução de mRNA foi injetada na solução de brPEI seguido por mistura usando uma pipeta eletrônica (Mettler-Toledo, E4 LTS 1.000 µL).

Após a mistura os complexos foram incubados por 20 min no gelo antes do uso.

Concentração de formulações

[00190] Antes do uso, a membrana de uma unidade de filtro centrífugo Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore, membrana PLHK Ultracel-PL, corte de peso molecular 100 kDa) foi lavada com 15 mL de água (500 × g). Então, a formulação de poliplexo foi transferida para a unidade de filtro e centrifugada a 500 × g e 4°C. Em um intervalo de 5 min, o nível de fluido foi verificado para evitar superconcentração e a solução foi misturada completamente com uma pipeta de 1 mL. A cada intervalo, a concentração da amostra foi monitorada por avaliação espectrofotométrica da concentração de ácido nucleico (A_{260}). Esse processo foi repetido até a concentração desejada ser atingida.

Medição de tamanho

[00191] Para a determinação do diâmetro de partícula, 200 µL de uma suspensão das partículas foram cheios em uma cubeta (Brand, UV-cuvette Micro) e medidos usando um Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments) dando os diâmetros hidrodinâmicos e o diâmetro hidrodinâmico médio (média z) em nm. Como um meio de suspensão, água ou água contendo um aditivo crioprotetor, como indicado, foi usada.

Desafio de congelamento-descongelamento

[00192] Após uma determinação inicial do tamanho de poliplexo (Malvern Zetasizer NanoZS), a formulação é distribuída em placas de PCR de baixo perfil de 96 poços (RNase e DNase livre, claro) e diluída 1:2 com soluções de aditivo 2X (20/10/2%) (Tabela 1). Uma amostra de cada formulação resultante foi usada para determinação do tamanho (Malvern Zetasizer NanoZS). As demais amostras foram congeladas a -20°C por ~16 h, descongeladas à RT e imediatamente armazenadas no gelo antes de as soluções atingirem RT. Uma amostra de cada formulação descongelada foi

então usada para determinação do tamanho (Malvern Zetasizer NanoZS) e comparada quanto ao% de desvio de tamanho de formulações antes de congelamento e após descongelamento de acordo com a equação seguinte, em que d_h indica o diâmetro de partícula médio z:

$$\text{desvio de tamanho [\%]} = \left(\frac{d_h \text{ (após congelamento)}}{d_h \text{ (antes do congelamento)}} - 1 \right) * 100 \%$$

Resultados

[00193] A capacidade da classe reivindicada das moléculas identificadas para agir como crioprotetor para nano ou micropartículas também a concentração de mRNA aumentada e/ou razão de N/P reduzida pode ser mostrada nesse experimento. Para esse propósito, 1,2-propanodiol foi escolhido como aditivo representativo. A Tabela 8 mostra a% de desvio de tamanho de partícula antes de congelamento versus após descongelamento de complexos congelados em diferentes concentrações de mRNA (0,25, 1,1 ou 2,3 mg/mL) e diferentes razões de N/P (N/P 4 ou 10). As razões em peso de mRNA/polímero/1,2-propanodiol empregadas são reportadas na Tabela 9.

Tabela 8: % de desvio de tamanho antes de congelamento versus após descongelamento. n = 3.

Razão de N/P	conc. de mRNA [mg/mL]	1,2-Propanodiol [% em p/v]					
		10			5		
4	0,25	-2	-1	4	12	15	17
4	1,1	5	15	6	25	29	20
10	2,3	20	20	21	17	22	22

[00194] Os dados mostram que todas as condições testadas levaram a evitar agregação usando o aditivo.

Tabela 9: razões em peso de mRNA/polímero/1,2-propanodiol do experimento anterior.

Razão de N/P	conc. de mRNA [mg/mL]	% em peso de 1,2-Propanodiol	mRNA [mg]	Polímero [mg]	1,2-Propanodiol [mg]
4	0,25	10	1	0,52	416,00
4	0,25	5	1	0,52	208,00
4	1,1	10	1	0,52	94,55
4	1,1	5	1	0,52	47,27
10	2,3	10	1	1,30	45,22
10	2,3	5	1	1,30	22,61

Discussão e Conclusão

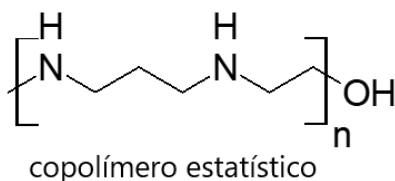
[00195] O Exemplo III demonstra que o tamanho de partícula pode ser mantido independentemente da razão de polímero para mRNA bem como da concentração de mRNA durante o congelamento.

Exemplo IV: Caráter de crioprotetor de aditivos identificados para diferentes polications (adição antes de mistura)

Formação de complexo

[00196] Complexos de polímero catiônico e mRNA que codifica para luciferase foram formados usando três diferentes estruturas poliméricas: poli(etilenimina) ramificada (brPEI, 25 kDa), poli(etilenimina-propilenimina) linear (P7, 20 kDa) ou poli(etilenimina-propilenimina) linear (P12, 24 kDa).

[00197] P7 e P12 são polímeros de poli(etilenimina-propilenimina) linear da seguinte estrutura:



Síntese:

[00198] Uma mistura de 2-etil-2-oxazolina seca e 2-etil-2-oxazina seca foi combinada com triflato de metila em acetonitrila. A polimerização foi realizada por 30 h a 130°C sob atmosfera de nitrogênio. A polimerização foi interrompida por adição de água e incubação por 3 h a 130°C. O polímero foi obtido por três etapas de precipitação em éter dietílico frio. Para hidrólise o polímero foi dissolvido em ácido clorídrico concentrado e incubado por 30 h a 130°C. O pH da solução de polímero foi ajustado a pH 10 com NaOH. Purificação foi realizada por meio de diálise contra água deionizada seguido por liofilização. Por meio de modificação da razão de 2-etil-2-oxazolina para 2-etil-2-oxazina, a razão de etilenimina (C2) para propilenimina (C3) resultante pode ser modificada no polímero. Com a quantidade usada de triflato de metila o peso molecular pode ser controlado.

[00199] Os polímeros resultantes tiveram as seguintes propriedades:

Nome do polímero	MW [g/mol]	razão de C2:C3 [mol:mol]
P7	28.300	1:1
P12	33.400	1:1

[00200] Complexos foram misturados a uma concentração final de 0,25 mg/mL nas três diferentes razões de N/P 4, 6 e 10. Em um processo de mistura padrão, mRNA foi diluído em água a uma concentração de 0,5 mg/mL. O mesmo volume de solução de polímero foi preparado (concentração vide Tabela 10) em água contendo 20% ou 10% (p/v) de 1,2-propanodiol. Nanopartículas foram formadas por injeção da solução de mRNA na solução de polímero seguido por mistura usando uma pipeta eletrônica (Mettler-Toledo, E4 LTS 1.000 µL). Após a mistura, os complexos foram incubados por 20 min no gelo antes do uso.

Tabela 10: Concentrações de soluções de polímero para a preparação de complexos em diferentes razões de N/P

Polímero	Concentração de solução de polímero para razão de N/P pretendida [mg/mL]		
	4	6	10
brPEI	0,26	0,39	0,65
P7	0,29	0,43	0,72
P12	0,29	0,43	0,72

Medição de tamanho

[00201] Para a determinação do diâmetro de partícula, 100 µL de uma suspensão das partículas foram cheios em uma cubeta (Brand, UV-cuvette Micro) e medidos usando um Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments) dando os diâmetros hidrodinâmicos e o diâmetro hidrodinâmico médio (média z) em nm. Como um meio de suspensão, água ou água contendo um aditivo crioprotetor, como indicado, foi usada.

Desafio de congelamento-descongelamento

[00202] Uma amostra de cada formulação resultante foi usada para determinação do tamanho (Malvern Zetasizer NanoZS). As demais amostras foram congeladas a -20°C por 16 h, descongeladas à RT e imediatamente

armazenadas no gelo antes de as soluções atingirem RT. Uma amostra de cada formulação descongelada foi então usada para determinação do tamanho (Malvern Zetasizer NanoZS) e comparada quanto ao % de desvio de tamanho de formulações antes de congelamento e após descongelamento de acordo com a equação seguinte:

$$\text{desvio de tamanho } [\%] = \left(\frac{d_h \text{ (após congelamento)}}{d_h \text{ (antes do congelamento)}} - 1 \right) * 100 \%$$

Preparação de amostra para experimentos in vivo

[00203] Complexos foram preparados como descrito em “formação de complexo” e “desafio de congelamento-descongelamento” a N/P 4 a um volume de 8 mL. As amostras foram mantidas congeladas até a nebulização nos animais.

Nebulização

[00204] Animais foram colocados em uma Câmara de Dosagem de Massa de Tamanho Pequeno Buxco (Data Sciences International, Alemanha). As formulações foram descongeladas à RT, colocadas em gelo moído antes de atingir RT e então nebulizadas usando um Nebulizador Aeroneb Solo (Aeroneb, Alemanha) a uma taxa de circulação de ar de 3 L/min e um ciclo de trabalho de 100%.

Medição de bioluminescência em pulmões explantados

[00205] 24 h após a aplicação, os animais foram colocados sob anestesia total através de injeção intraperitoneal de Fentanil/Midazolam/Medetomidina (0,05/5,0/0,5 mg/kg BW). 50 µL de D-Luciferina (30 mg/mL dissolvidos em salina tamponada com fosfato, pH 7) foram aplicados por meio da via de aspiração (inalação de solução após ela ter sido diretamente aplicada às narinas) e 100 µL de D-Luciferina foram aplicados sistemicamente por injeção intraperitoneal. Em 10 min após administração de Luciferina, os camundongos foram eutanizados por meio de luxação cervical. Após perfusão com PBS por meio do coração direito os

pulmões foram explantados. A bioluminescência foi medida usando um Xenogen IVIS Luminar XR (Caliper LifeSciences) com uma classificação definida em 8 e um tempo de exposição de 5 min. A bioluminescência foi quantificada e analisada usando Software Living Image 4.4 (Xenogen). Em caso de imagens sobressaturadas (detecção de expressão fora da faixa linear), o tempo de exposição foi reduzido para 1 min. A bioluminescência foi medida como fluxo total por órgão (em fótons/s). Apenas imagens sem sobressaturação foram usadas para análise. Os pulmões foram congelados rapidamente e armazenados a -80°C.

Atividade de luciferase em pulmões homogeneizados

[00206] Órgãos foram pesados e metade dos pulmões explantados foi homogeneizada em tampão de lise usando um Homogeneizador FastPrep^o-24 (MP Biomedicals). 100 µL de tampão de Luciferina foram adicionados automaticamente pelo Lumat LB 9507 Luminometer (Berthold Technologies) a 75 µL de lisatos centrifugados. A atividade de luciferase foi medida em RLU/s e convertida em RLU/órgão.

Resultados

[00207] Os Exemplos I – III demonstram a eficiência dos aditivos em prevenção de agregação mantendo ao mesmo tempo eficiência *in vivo* em diferentes condições apenas com partículas formadas com poli(etilenimina) ramificada. Para demonstrar que a funcionalidade desses aditivos é independente das características do polímero, diferentes tipos de polímeros foram testados. 1,2-Propanodiol foi escolhido como um aditivo exemplar. Os polímeros foram variados em tipo de ramificação (ramificados e lineares), peso molecular (20 kDa, 24 kDa e 25 kDa), composição de monômero (poli(etilenimina) e poli(etilenimina-propilenimina)) bem como razão de N/P (4, 6 e 10). Os polímeros escolhidos demonstraram funcionalidade após nebulização. Resultados da % de desvio de tamanho de partículas antes de congelamento e após descongelamento para duas diferentes concentrações de

aditivo são mostrados como desvio de tamanho na Tabela 10. A razão de N/P (N/P 4) foi também testada quanto a funcionalidade *in vivo*. Um sumário de dados de eficiência é dado na Figura 4 bem como na Tabela 13. As razões em peso de mRNA/polímero/1,2-propanodiol empregadas são reportadas na Tabela 12 e Tabela 14b.

Tabela 11: % de desvio de tamanho de formulações de complexo com diferentes polímeros contendo 5% ou 10% (p/v) de 1,2-Propanodiol antes de congelamento versus após descongelamento.

Concentração de mRNA [mg/mL]	Polímero	MWt [kDa]	Tipo	5% de 1,2-Propanodiol			10% de 1,2-Propanodiol		
				N/P 4	N/P 6	N/P 10	N/P 4	N/P 6	N/P 10
0,25	brPEI	25	ramificado	27	-22	8	12	7	1
	P7	20	linear	31	23	37	9	3	7
	P12	24	linear	12	0	48	48	4	2

Tabela 12: Razões em peso de mRNA/polímero/1,2-propanodiol do experimento anterior.

Polímero	Razão de N/P	% em p/v de 1,2-Propanodiol	mRNA [mg]	Polímero [mg]	1,2-Propanodiol [mg]
brPEI 25kDa	4	5%	1	0,52	208
brPEI 25kDa	6	5%	1	0,78	208
brPEI 25kDa	10	5%	1	1,30	208
brPEI 25kDa	4	10%	1	0,52	416
brPEI 25kDa	6	10%	1	0,78	416
brPEI 25kDa	10	10%	1	1,30	416
P7	4	5%	1	0,58	208
P7	6	5%	1	0,87	208
P7	10	5%	1	1,44	208
P7	4	10%	1	0,58	416
P7	6	10%	1	0,87	416
P7	10	10%	1	1,44	416
P12	4	5%	1	0,58	208
P12	6	5%	1	0,87	208
P12	10	5%	1	1,45	208
P12	4	10%	1	0,58	416
P12	6	10%	1	0,87	416
P12	10	10%	1	1,45	416

[00208] A Figura 4 mostra a eficiência de transfecção *in vivo* de formulações de polímero/mRNA concentradas.

[00209] 2 mg de mRNA que codifica para luciferase de vagalume complexados com brPEI 25kDa/P7/P12 a N/P 4 foram nebulizados em camundongos tanto após preparação fresca (0,25 mg/mL de mRNA; 8 mL/grupo) quanto em um ciclo de congelamento-descongelamento (1 mg/mL

de mRNA; 2 mL/grupo) na presença dos aditivos indicados. 24 h após o tratamento os camundongos foram anestesiados e os pulmões explantados. A atividade de luciferase foi medida em homogenatos de pulmão. n = 3

Tabela 13: Dados tabulados da Figura 4.

Dose/grupo de Fluc mRNA	Polímero	conc. de mRNA [mg/mL]	Aditivo		Bioluminescência (pulmões explantados)		Atividade de luciferase (homogenatos)	
			Tipo	Conc. [% em p/v]	Fluxo Total [fóton/s]	STDEV	[RLU/órgão]	STDEV
2 mg	brPEI	0,25	complexo fresco	0	64467	6809	2920	1108
	P7	0,25		0	286000	171128	27721	17186
	P12	0,25		0	202733	98217	24633	13277
	brPEI	1	1,2-Propanodiol	5	45500	24307	3152	2717
	P7	1		5	589667	274906	31606	10180
	P12	1		5	537667	367406	34458	21217
	brPEI	1		10	45967	7565	3303	1548
	P7	1		10	243.000	156506	17646	12823
	P12	1		10	289000	205691	31692	30625

Tabela 14a: Tamanho padrão de um complexo recém-preparado medido com o ZetaSizer (Malvern)

Carreador	Diâmetro hidrodinâmico (média z [nm])	PdI
brPEI, N/P 4	158,7	0,180
P7, N/P 4	161,1	0,171
P12, N/P 4	163,5	0,177

Tabela 14b: Razões em peso de mRNA/polímero/1,2-propanodiol do experimento anterior.

Polímero	Razão de N/P	% em p/v de 1,2-Propanodiol	mRNA [mg]	Polímero [mg]	1,2-Propanodiol [mg]
brPEI 25kDa	4	5%	1	0,52	208
brPEI 25kDa	4	10%	1	0,52	416
P7	4	5%	1	0,58	208
P7	4	10%	1	0,58	416
P12	4	5%	1	0,58	208
P12	4	10%	1	0,58	416

Discussão e Conclusão

[00210] Como mostrado nesse experimento, o efeito estabilizante de 1,2-propanodiol é independente do tipo de ramificação de polímero, peso molecular, composição de monômero bem como razão de N/P. Variação de todos esses parâmetros resultou em complexos intactos após um desafio de congelamento descongelamento. Adicionalmente, a funcionalidade desses complexos após a aplicação pulmonar pode ser demonstrada em experimentos *in vivo*. Nenhuma diferença significativa de complexos frescos comparados

aos mesmos complexos congelados em 5% ou 10% de 1,2-Propanodiol com relação aos níveis de expressão de proteína repórter pode ser detectado. As diferenças gerais da eficiência de poli(etilenimina) ramificada versus poli(etilenimina-propilenimina) são em total consentimento com a declaração de WO2013182683A1. Adicionalmente, esse experimento confirmou que o ponto de tempo de adição de aditivo não tem nenhuma influência na sua funcionalidade. Embora aditivos tenham sido adicionados às nanopartículas após complexação em experimento I e II, nesse experimento 1,2-propanodiol foi adicionado à solução de polímero antes de ele ter sido misturado com a solução de mRNA.

Exemplo V: Estabilidade de complexos congelados

Formação de complexo

[00211] Complexos de (polietilenimina) (brPEI) ramificada e mRNA que codifica para luciferase foram formados a uma concentração de 0,25 mg/ml. Em um processo de mistura padrão, mRNA foi diluído em água a uma concentração de 0,5 mg/mL. O mesmo volume de solução de brPEI foi preparado a uma concentração tanto de 0,65 mg/mL de água quanto de 10% de 1,2-Propanodiol. Para formular as nanopartículas a solução de mRNA foi injetada na solução de brPEI seguido por mistura usando uma pipeta eletrônica (Mettler-Toledo, E4 LTS 1.000 µL). Após a mistura os complexos foram incubados por 20 min no gelo antes do uso.

Desafio de congelamento-descongelamento

[00212] Após uma determinação inicial do tamanho de poliplexo (Malvern Zetasizer NanoZS), 100 µL de triplicatas de cada formulação foram armazenados congelados a -20°C pelo tempo indicado, descongelados à RT e imediatamente armazenados no gelo antes de as soluções atingirem RT. Uma amostra de cada formulação descongelada foi então usada para determinação do tamanho (Malvern Zetasizer NanoZS) e comparada quanto ao% de desvio de tamanho de formulações antes de congelamento e após descongelamento

de acordo com a equação seguinte, em que d_h indica o diâmetro de partícula médio z:

$$\text{desvio de tamanho [\%]} = \left(\frac{d_h \text{ (após congelamento)}}{d_h \text{ (antes do congelamento)}} - 1 \right) * 100 \%$$

Medição de integridade de mRNA

[00213] Formulações de nanopartícula foram diluídas em água a 0,2 mg/mL de mRNA. 5 µL dessa diluição foram tratados com 3 µL 40 mg/mL de Heparina, 2 µL de v/v Triton X-100 2% e 10 µL de Formamida. A mistura foi incubada por 15 min a 70°C para rompimento de partícula completo e então mantida em gelo moído. Análise de fragmento de ácido nucleico foi então conduzida por eletroforese capilar (Analisador de Fragmento Analítico Avançado, PROSize 2.0). O sinal para mRNA de comprimento total das formulações tratadas (mRNA_{tratado}) foi comparado ao do mRNA não complexado, fresco (mRNA_{ref}) do mesmo Lote que foi usado para formulação como uma referência e expresso como integridade de mRNA [%] de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{integridade do mRNA [\%]} = \left(\frac{\text{mRNA}_{\text{tratado}}}{\text{mRNA}_{\text{ref}}} \right) * 100 \%$$

Resultados

[00214] Um parâmetro crítico para nano ou micropartículas baseadas em mRNA é a estabilidade de mRNA no complexo. Como mostrado na Tabela 15, o armazenamento de complexos a 25°C resulta em degradação rápida do mRNA complexado. Nesse experimento a influência de capacidade de congelar os complexos na estabilidade do RNA complexado foi testada. No primeiro conjunto, os complexos foram formados com RNA e congelados após adição de 1,2-propandiol como um candidato exemplar do grupo de aditivos de bom desempenho. A integridade do mRNA (quantidade de mRNA de comprimento total) no complexo foi testada antes do congelamento e uma semana após o armazenamento a -20°C. MRNA não complexado, fresco foi

medido e definido a 100% como uma referência. Os resultados são sumarizados na Tabela 16.

[00215] Em um segundo conjunto o experimento foi repetido após o armazenamento dos complexos por oito semanas a -20°C. Resultados são representados na Tabela 17.

Tabela 15: Integridade de mRNA em complexos à RT.

Polímero	Integridade de mRNA [%]		
	0 h	1,5 h	3 h
brPEI	100	77,5	56,4

Tabela 16: Integridade de mRNA em complexos congelados (5% de 1,2-Propanodiol, -20°C, 1 semana) versus poliplexos recém-preparados ou mRNA fresco.

Amostra	Integridade de mRNA [%]
mRNA fresco	100
poliplexo fresco	98
1-semana FT poliplexo (triplicata)	94,7 ± 0,7

Tabela 17: Integridade de mRNA em complexos congelados (5% de 1,2-Propanodiol, -20°C, 8 semanas) versus mRNA fresco.

Amostra	Integridade de mRNA [%]
mRNA fresco	100
8-semana FT poliplexo (triplicata)	98,9 ± 7,5

Discussão e Conclusão

[00216] Os experimentos descritos mostram o forte benefício da capacidade de congelar nano ou micropartículas para armazenamento a longo prazo. Embora complexos armazenados à temperatura ambiente levem a um processo de degradação do mRNA dentro de horas, complexos armazenados em um estado congelado resultam em mRNA totalmente preservado por pelo menos oito semanas.

Exemplo VI: 1,2-Propanodiol como crioprotetor para formulações a base de lipídio

Formação de complexo

[00217] Componentes de lipídio (lipoide catiônico, colesterol de lipídio auxiliar e lipídio PEG) foram solubilizados e misturados em isopropanol e

injetados a uma razão volumétrica de 1:4 em uma solução de mRNA em tampão de citrato (ácido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, pH 4,5) resultando em uma concentração de mRNA de 0,2 mg/mL. Complexos foram incubados por 20 min à RT. Após incubação a solução foi dialisada contra água por 16 h. A concentração de mRNA após diálise foi 0,13 mg/mL. Para atingir uma concentração de mRNA de 0,2 ou 0,5 mg/mL as partículas foram concentradas em um SpeedVac (Concentrator Plus, Eppendorf) a 45°C.

Medição de tamanho

[00218] Para a determinação do diâmetro de partícula, 200 µL de uma suspensão das partículas foram cheios em uma cubeta (Brand, UV-cuvette Micro) e medidos usando um Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments) dando os diâmetros hidrodinâmicos e o diâmetro hidrodinâmico médio (média z) em nm. Como um meio de suspensão, água ou água contendo um aditivo crioprotetor, como indicado, foi usada.

Desafio de congelamento-descongelamento

[00219] As formulações foram diluídas 1:2 com soluções de 1,2-propanodiol 2X (20 ou 10%) e divididas em diferentes amostras. Uma amostra de cada formulação resultante foi usada para determinação do tamanho (Malvern Zetasizer NanoZS) na presença de aditivo. As demais amostras foram congeladas a -20°C por 16 h, descongeladas à RT e imediatamente armazenadas no gelo antes de as soluções atingirem RT. Uma amostra de cada formulação descongelada foi então usada para determinação do tamanho (Malvern Zetasizer NanoZS) e comparada quanto ao% de desvio de tamanho de formulações antes de congelamento e após descongelamento de acordo com a equação seguinte, em que d_h indica o diâmetro de partícula médio z:

$$\text{desvio de tamanho [\%]} = \left(\frac{d_h \text{ (após congelamento)}}{d_h \text{ (antes do congelamento)}} - 1 \right) * 100 \%$$

Aplicação de pulverização intratraqueal

[00220] 50 µL de solução complexa foram aplicados intratraquealmente usando um dispositivo Micropulverizador 1A (PennCentury, USA) sob anestesia de Isoflurano por inalação.

Medição de bioluminescência em pulmões explantados

[00221] 24 h após a aplicação, os animais foram colocados sob anestesia total através de injeção intraperitoneal de Fentanil/Midazolam/Medetomidina (0,05/5,0/0,5 mg/kg BW). 50 µL de D-Luciferina (30 mg/mL dissolvidos em salina tamponada com fosfato, pH 7) foram aplicados por meio da via de aspiração (inalação de solução após ela ter sido diretamente aplicada às narinas) e 100 µL de D-Luciferina foram aplicados sistemicamente por injeção intraperitoneal. Em 10 min após administração de Luciferina, os camundongos foram eutanizados por meio de luxação cervical. Após perfusão com PBS por meio do coração direito os pulmões foram explantados. A bioluminescência foi medida usando um Xenogen IVIS Luminar XR (Caliper LifeSciences) com uma classificação definida em 8 e um tempo de exposição de 5 min. A bioluminescência foi quantificada e analisada usando Software Living Image 4.4 (Xenogen). Em caso de imagens sobressaturadas (detecção de expressão fora da faixa linear), o tempo de exposição foi reduzido para 1 min. A bioluminescência foi medida como fluxo total por órgão (em fótons/s). Apenas imagens sem sobressaturação foram usadas para análise. Os pulmões foram congelados rapidamente e armazenados a -80°C.

Atividade de luciferase em pulmões homogeneizados

[00222] Órgãos descongelados foram pesados e metade de pulmões explantados foi homogeneizada em tampão de lise usando um Homogeneizador FastPrep^o-24 (MP Biomedicals). 100 µL de tampão de Luciferina foram adicionados automaticamente pelo Lumat LB 9507 Luminometer (Berthold Technologies) a 75 µL de lisatos centrifugados. A atividade de luciferase foi medida em RLU/s e convertida em RLU/órgão.

Resultados

[00223] Esse exemplo demonstra a adequabilidade dos aditivos definidos aqui como crioprotetores para complexos a base de lipídio. Em uma primeira etapa, nanopartículas foram formadas e desafiadas com um ciclo de congelamento-descongelamento na presença ou ausência de aditivos. O tamanho foi medido antes de congelamento e após descongelamento. 1,2-propanodiol foi escolhido como representativo do grupo de substâncias. O experimento foi realizado em diferentes concentrações de complexo (0,2 e 0,5 mg/mL) bem como em diferentes concentrações de aditivo (5% e 10% (p/v)). A diferença de tamanho é sumarizada na Tabela 18b.

Tabela 18a: Tamanho padrão de um complexo recém-preparado medido com o ZetaSizer Nano ZS (Malvern)

Carreador	Diâmetro hidrodinâmico (média z [nm])	PdI
LNP	46,39	0,075
	45,73	0,071
	45,57	0,099

Tabela 18b: Desvio de tamanho em% de diferentes formulações de poliplexo contendo 5% ou 10% de 1,2-Propanodiol antes de congelamento versus após descongelamento.

Aditivo	Conc. de complexo [mg mRNA/mL]	
	0,2	0,5
nenhum	254	n/a
5% de 1,2-Propanodiol	16	24
10% de 1,2-Propanodiol	9	16

[00224] Como mostrado na Tabela 18b, 1,2-propanodiol estabiliza o tamanho de partícula durante um desafio de congelamento-descongelamento também para complexos a base de lipídio. Assim, a eficiência em transfecção após distribuição pulmonar foi testada em uma etapa seguinte. Para esse propósito uma dose de 10 µg mRNA que codifica para luciferase de vagalume foi aplicada aos camundongos Balb/c por meio de injeção por micropulverização na traqueia. Resultados da detecção da proteína produzida como medido para a eficiência de distribuição e assim funcionalidade do carreador são mostrados na Figura 5 e Tabela 19.

[00225] A Figura 5 mostra a eficiência de transfecção *in vivo* de

partículas nano ou micropartículas a base de lipídio após congelamento com 1,2-propanodiol.

[00226] Complexos contendo mRNA que codifica para luciferase de vagalume foram preparados com ou sem 1,2-propanodiol e aplicados intratraquealmente aos camundongos por meio de micropulverização após tanto armazenamento a 4°C quanto um ciclo de congelamento-descongelamento. 24 h após o tratamento os camundongos foram anestesiados e os pulmões explantados para medição de atividade de luciferase. n = 3.

Tabela 19: Dados tabulados da Figura 5 (incluindo bioluminescência em pulmões explantados)

Dose de FLuc mRNA /animal	Aditivo		Comentário	Bioluminescência (pulmões explantados)		Atividade de luciferase (homogenatos)	
	Tipo	Conc. [% em p/v]		Fluxo Total (fóton/s)	STDEV	RLU/órgão	STDEV
10 µg	complexo fresco	0	fresco	8106000	1824.000	2263125	98203
	1,2-Propanodiol	5	fresco	18522000	15191171	976173	256302
	1,2-Propanodiol	5	congelado	21634667	21475152	6637646	4472781

[00227] Como pode ser visto na Figura 5 e Tabela 19, complexos congelados na presença de 1,2-propanodiol mantiveram funcionalidade total após aplicação *in vivo*. Assim, o aditivo tem no negative influência na eficiência de transfecção.

Discussão e Conclusão

[00228] Os dados apresentados nesse exemplo mostram que 1,2-propanodiol permitem o congelamento não apenas de complexos a base de polímero, mas também de complexos a base de lipídio prevenindo-os de agregação e preservando a atividade *in vivo*.

Breve descrição das figuras

[00229] Figura 1: Eficiência de transfecção de formulações de brPEI/FLuc mRNA N/P 10 contendo aditivos em células A549

Figura 2: Eficiência de transfecção *in vivo* de formulações de brPEI/mRNA após um ciclo de congelamento-descongelamento

Figura 3: Eficiência de transfecção *in vivo* de formulações de

brPEI/mRNA após um ciclo de congelamento-descongelamento. Linha pontilhada: 50% de atividade de partícula fresca.

[00230] Figura 4: Eficiência de transfecção *in vivo* de formulações concentradas de polímero/mRNA

Figura 5: Eficiência de transfecção *in vivo* das nano ou micropartículas a base de lipídio após congelamento em 1,2-propanodiol

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:
 - (i) uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e
 - (ii) pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi.
2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o agente terapeuticamente ativo é um ácido nucleico.
3. Composição de acordo com a reivindicação 2, caracterizada pelo fato de que o agente terapeuticamente ativo é mRNA.
4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que a formulação de nano ou micropartícula mostra um diâmetro de partícula médio na faixa de 1 a 4.000 nm, mais preferivelmente 2 a 2.500 nm, e o mais preferivelmente 5 a 1.000 nm.
5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 2 a 4, caracterizada pelo fato de que o agente terapeuticamente ativo é um ácido nucleico e as partículas da formulação de nano ou micropartícula compreendem o ácido nucleico e um excipiente catiônico.
6. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que as partículas da formulação de partícula compreendem o ácido nucleico na forma de um complexo formado pelo ácido nucleico e um oligômero catiônico ou um polímero catiônico como o excipiente catiônico.
7. Composição de acordo com a reivindicação 5, caracterizada pelo fato de que as partículas da formulação de partícula compreendem o ácido nucleico na forma de um complexo formado pelo ácido nucleico e um lipídio catiônico ou um lipóide catiônico como o excipiente catiônico.
8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que o aditivo crioprotetor

compreende pelo menos um grupo hidróxi secundário.

9. Composição de acordo com a reivindicação 8, caracterizada pelo fato de que o aditivo crioprotetor é selecionado dentre 1,2-propanodiol, 2-propanol, 1,2-butanodiol, e 1,3-butanodiol.

10. Composição de acordo com a reivindicação 9, caracterizada pelo fato de que o aditivo crioprotetor é 1,2-propanodiol.

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que o aditivo crioprotetor é contido a uma concentração de 0,5 a 50% em p/v, com base no volume da fase líquida.

12. Composição sólida, caracterizada pelo fato de que compreende:

(i) uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo, e

(ii) pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi,

que é obtenível congelando a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

13. Processo para a preparação de uma composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 11, caracterizado pelo fato de que o dito processo compreende:

a) prover uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e

b) adicionar pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi à fase líquida, em que a adição do aditivo crioprotetor à fase líquida pode ser realizada antes, durante ou após prover a formulação de partícula suspensa na fase líquida.

14. Processo para a preparação da composição sólida de acordo com a reivindicação 12, caracterizado pelo fato de que o dito processo

compreende:

uma primeira etapa de preparar uma composição de acordo com o primeiro aspecto anterior por um processo compreendendo

a) prover uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e

b) adicionar pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi à fase líquida, em que a adição do aditivo crioprotetor à fase líquida pode ser realizada antes, durante ou após prover a formulação de partícula suspensa na fase líquida,

e uma segunda etapa de congelar a composição obtida na primeira etapa.

15. Método para preservar uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo, caracterizado pelo fato de que o dito método compreende prover uma composição em suspensão como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11, e congelar a composição.

16. Uso de um composto selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi, caracterizado pelo fato de ser como um aditivo crioprotetor para uma composição compreendendo uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo.

17. Dispositivo, caracterizado pelo fato de ser para formar um aerossol a partir de uma composição de particulado suspensa em um líquido ou para nebulizar uma composição como essa, cujo dispositivo compreende a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 11.

18. Dispositivo de acordo com a reivindicação 17, caracterizado pelo fato de que o dispositivo é um inalador selecionado dentre um inalador de dose medida, um nebulizador, e um dispositivo de pulverização nasal.

19. Composição de acordo com qualquer uma das

reivindicações 1 a 11 para uso no tratamento ou prevenção de uma doença, caracterizada pelo fato de que a composição deve ser administrada ao ou por meio do trato respiratório.

20. Composição para uso de acordo com a reivindicação 19, caracterizada pelo fato de que a composição deve ser administrada por meio de administração pulmonar ou por meio de administração nasal.

Fig. 1

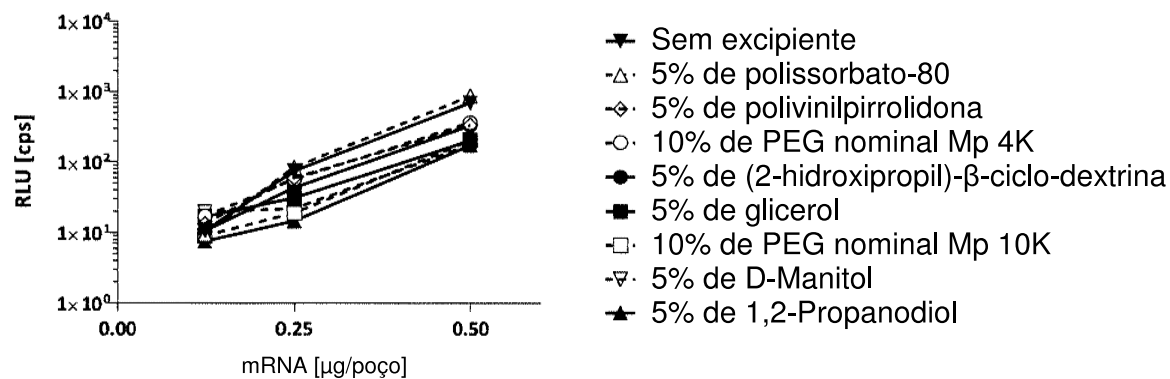


Fig. 2

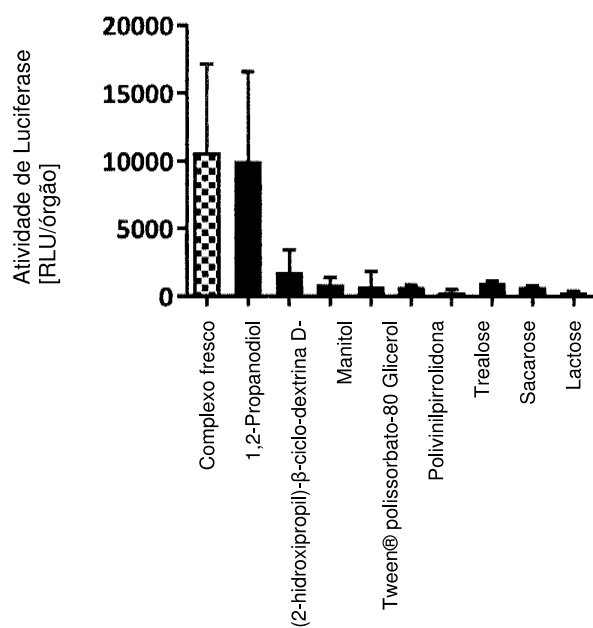


Fig. 3

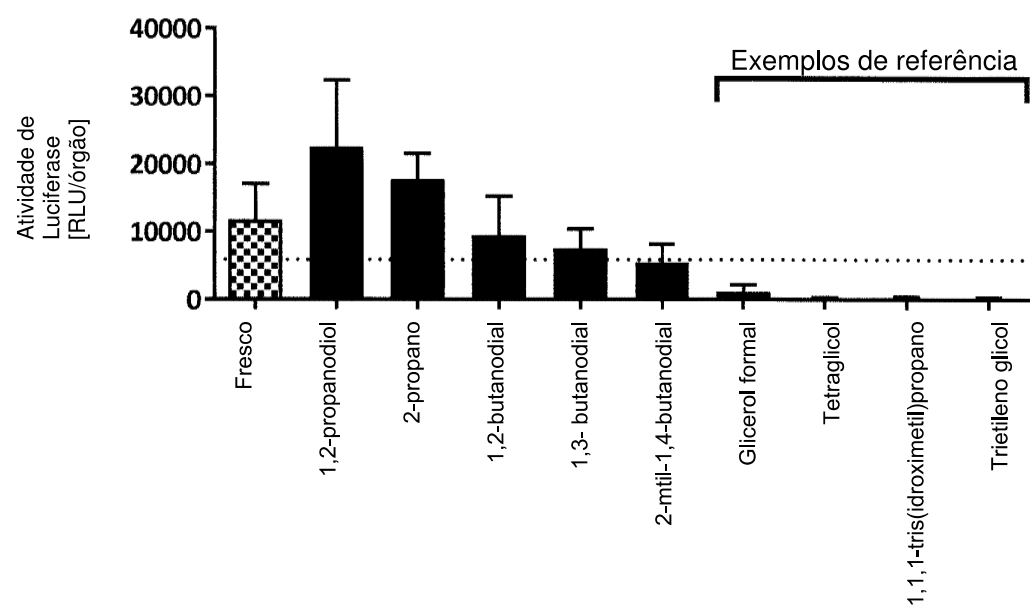


Fig. 4

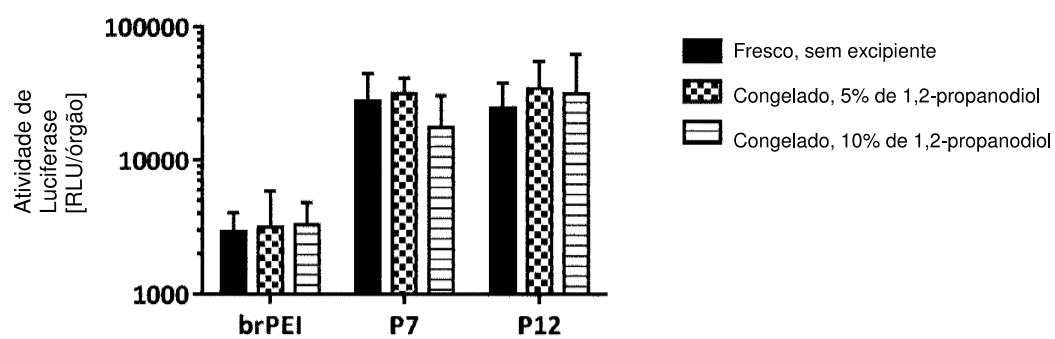
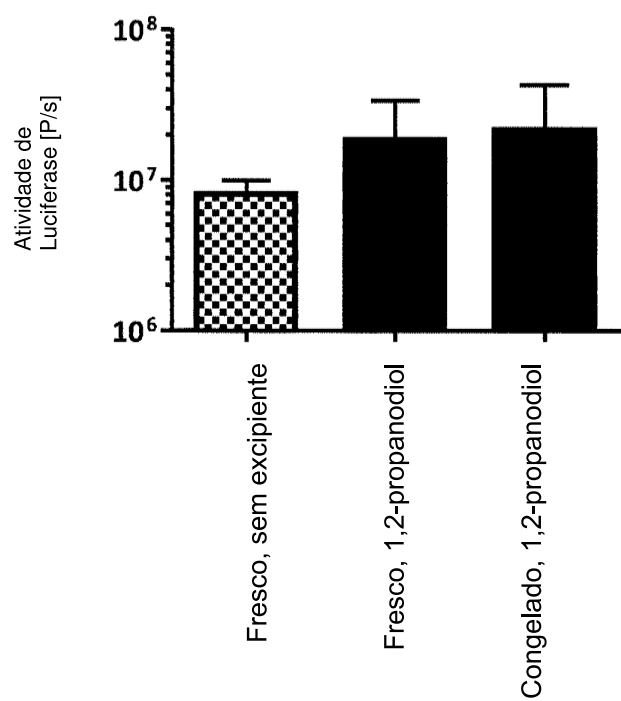


Fig. 5



RESUMO

COMPOSIÇÃO, COMPOSIÇÃO SÓLIDA, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO, MÉTODO PARA PRESERVAR UMA FORMULAÇÃO DE NANO OU MICROPARTÍCULA DE UM AGENTE TERAPEUTICAMENTE ATIVO, USO DE UM COMPOSTO SELECIONADO DE ALCANOS C₃-C₅ SUBSTITUÍDOS COM UM OU DOIS GRUPOS HIDRÓXI, E, DISPOSITIVO

É provida uma composição compreendendo (i) uma formulação de nano ou micropartícula de um agente terapeuticamente ativo que é suspenso em uma fase líquida, e (ii) pelo menos um aditivo crioprotetor selecionado de alcanos C₃-C₅ substituídos com um ou dois grupos hidróxi que estabiliza a formulação de partícula. Aspectos adicionais se referem a uma composição sólida que pode ser obtida congelando a composição estabilizada, e a processos para a preparação das composições de acordo com a invenção.