



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

(21) BR 112020021054-4 A2



(22) Data do Depósito: 25/04/2019

(43) Data da Publicação Nacional: 17/02/2021

(54) **Título:** COMPOSIÇÃO, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO, E, COMPOSIÇÕES SÓLIDA E PARA USO

(51) **Int. Cl.:** A61K 47/10; A61K 9/127; A61K 48/00; 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; OLGA MYKHAILYK.

(86) **Pedido PCT:** PCT EP2019060644 de 25/04/2019

(87) **Publicação PCT:** WO 2019/207060 de 31/10/2019

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

(57) **Resumo:** "COMPOSIÇÃO, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO, E, COMPOSIÇÕES SÓLIDA E PARA USO". A invenção provê uma composição que é adequada para a distribuição de RNA, cuja composição compreende (i) partículas contidas em uma fase líquida, em que as partículas compreendem RNA e uma composição de lipídio, e (ii) 1,2 propanodiol. A composição de lipídio compreende (i-a) um derivado de colesterol, (i-b) um fosfoglicerídeo, e (i-c) um fosfoglicerídeo peguado. Adicionalmente são providos um método para preparar a composição, e uma composição sólida que é obtível congelando a composição em que partículas são contidas em uma fase líquida.

%PG		0	5
N/P	3		
	5		

COMPOSIÇÃO, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO, E, COMPOSIÇÕES SÓLIDA E PARA USO

[001] A presente invenção se refere composições a base de lipídio que podem ser usadas para a administração eficiente de um RNA a um sujeito.

[002] Várias formulações a base de lipídio são conhecidas na técnica que podem agir como vetores para ácidos nucleicos de maneira a permitir que elas sejam distribuídas ao corpo de um paciente, por exemplo, A.C. Silva *et al.*, Current Drug Metabolism, 16, 2015, 3-16, e a literatura referida nos mesmos. Uma formulação que foi testada com êxito em estudos clínicos para distribuição de pDNA por meio de inalação é GL67A (E. Alton *et al.*, Efficacy and Mechanism Evaluation, Vol. 3, Issue 5, July 2016). A formulação GL67A contém, junto com pDNA como um ácido nucleico terapeuticamente ativo, GL67 (também conhecido como Genzyme Lipid 67, um colesterol cationicamente derivatizado), 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) e 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000 (DMPE-PEG5000).

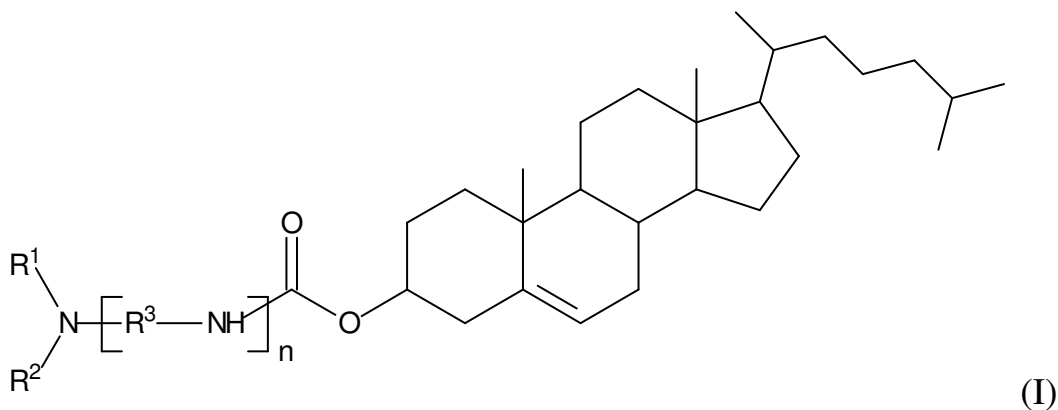
[003] Entretanto, a formulação mostra uma estabilidade limitada ($t_{1/2}$: 6h), de maneira tal que ela teve de ser preparada logo antes de sua aplicação. Além disso, observou-se que a formulação de lipídio era ineficaz para a transfecção de RNA *in vivo* (O. Andries *et al.*, Molecular Pharmaceutics 2012, 9, 2136-2145). Em vista desses problemas, permanece uma necessidade de formulações que podem agir como vetores eficazes para a distribuição de RNA *in vivo* provendo ao mesmo tempo um perfil toxicológico benéfico.

[004] No contexto da presente invenção, observou-se que a presença de 1,2-propanodiol (também referido como propileno glicol) leva a um aumento significativo da eficiência de transfecção de formulações a base de lipídio do tipo usado em GL67A que contém RNA como um ácido nucleico.

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

(i) partículas contidas em uma fase líquida, em que as partículas compreendem RNA e uma composição de lipídio, e em que a composição de lipídio compreende:

(i-a) um derivado de colesterol da fórmula (I) ou um sal do mesmo:



em que

n é 0 ou 1, preferivelmente 0,

R^1 é um grupo $-(CH_2)_q-NH_2$ ou um grupo $-(CH_2)_r-NH-(CH_2)_s-NH_2$,

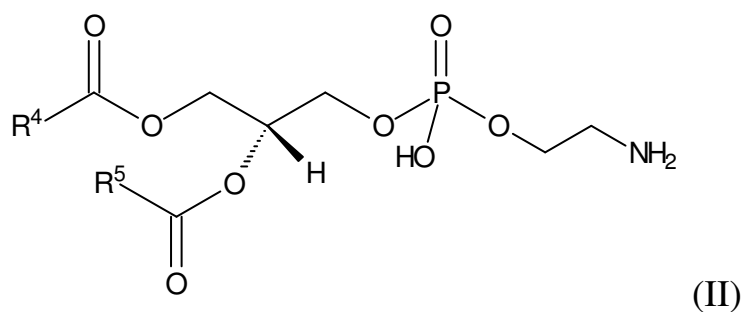
em que q , r e s são independentemente um número inteiro de 2 a 6,

R^2 é um grupo $-(CH_2)_t-NH_2$ ou um grupo $-(CH_2)_u-NH-(CH_2)_w-NH_2$,

em que t , u e w são independentemente um número inteiro de 2 a 6,

R^3 é um grupo alcanodi-ila linear tendo 1 a 4 átomos de carbono;

(i-b) um fosfoglicerídeo da fórmula (II) ou um sal do mesmo:



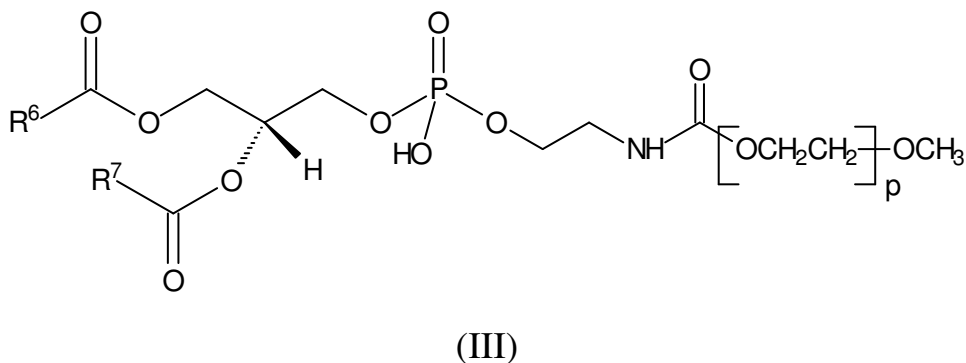
em que

R^4 é um grupo alquila linear tendo 10 a 20 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 20 átomos de carbono;

R^5 é um grupo alquila linear tendo 10 a 20 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 20 átomos de carbono;

e

(i-c) um fosfoglicerídeo peguilado da fórmula (III) ou um sal do mesmo:



em que

p é um número inteiro de 5 a 200, preferivelmente 10 a 170 e acima de tudo preferivelmente 10 a 140

R^6 é um grupo alquila linear tendo 10 a 20 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 20 átomos de carbono;

R^7 é um grupo alquila linear tendo 10 a 20 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 20 átomos de

carbono;

e

(ii) 1,2-propanodiol.

[006] Um segundo aspecto da invenção se refere a um processo para a preparação de uma composição de acordo com o primeiro aspecto descrito anteriormente, o dito processo compreendendo as etapas de:

a) dissolver e misturar os componentes da composição de lipídio em um solvente orgânico, seguido pela liofilização da composição de lipídio;

b) reidratar a composição de lipídio liofilizada por meio de adição de água;

c) combinar a composição de lipídio reidratada com uma solução aquosa do RNA para permitir que partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio sejam formadas que estão contidas em uma fase líquida;

d) adicionar 1,2-propanodiol.

[007] A adição do 1,2-propanodiol pode ser convenientemente realizada, por exemplo, adicionando-o junto com água na etapa b), adicionando-o à composição de lipídio reidratada após a etapa b), adicionando-o junto com a solução aquosa do RNA na etapa c), ou adicionando-o à fase líquida após a etapa c), em que as partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio estão contidas. Deve-se perceber que a adição pode ser realizada em uma etapa ou em múltiplas etapas, por exemplo, em diferentes estágios do processo.

[008] Além disso, observou-se que o 1,2-propanodiol pode intensificar a estabilidade de formulações de partícula de RNA durante congelamento, por exemplo, quando uma formulação de partícula como essa é congelada para armazenamento ou manuseio. Em outras palavras, o 1,2-propanodiol pode também funcionar como um crioprotetor para partículas

compreendendo RNA e a composição de lipídio.

[009] Assim, de acordo com um terceiro aspecto, a presente invenção provê uma composição sólida compreendendo:

(i) partículas compreendendo RNA e uma composição de lipídio, e

(ii) 1,2-propanodiol,

cujas composições sólidas são obtíveis congelando a composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção como definido anteriormente.

[0010] Em seguida, uma descrição detalhada será provida 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.

RNA

[0011] A composição e a composição sólida de acordo com a invenção compreendem ácido ribonucleico (RNA), mais preferivelmente RNA de fita única, e mais preferivelmente é mRNA.

[0012] 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 à 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 estruturas secundárias (por exemplo, laços e haste-laços) ou terciária.

[0013] 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 contêm elementos de DNA funcionais que não codificam para proteínas. Essas sequências não codificantes 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 codificantes (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 codificantes 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. O RNA pode ser produzido por metodologia química sintética e enzimática conhecida por um versado na técnica, ou pelo uso de tecnologia recombinante, ou pode ser isolado de fontes naturais, ou por uma combinação das mesmas.

[0014] 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.

[0015] No contexto da presente invenção, mRNA deve ser entendido significando qualquer molécula de poli-ribonucleotídeo que, se ele fica dentro da célula, é adequado 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 sequências 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.

[0016] O mRNA contém uma sequência de ribonucleotídeos que codifica uma proteína ou fragmento da mesma, cuja função na célula ou nas vizinhanças 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 codificante 3' ou 5'. As regiões não codificante 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.

[0017] Em uma modalidade preferida, o mRNA contém um cap 5' (*five-prime-cap*; cap-0) que consiste em um m⁷GpppG conectado ao mRNA por meio de uma ligação de trifosfato 5' a 5', um grupo metila adicional no penúltimo nucleotídeo da extremidade 5' do mRNA (Cap-1, Análogo Anti-Reverso do Cap (ARCA)) e/ou 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 promovem tradução tais como, por exemplo, estruturas do cap-2 ou estruturas de haste-laço de histona.

[0018] Como notado anteriormente, a menos que indicado de outra forma em um contexto específico, o termo mRNA como usado aqui engloba mRNA modificado, isto é, o mRNA pode ser mRNA modificado.

[0019] Em uma outra modalidade, o mRNA contém ácidos nucleicos marcados (preferivelmente, nucleotídeos e/ou ribonucleotídeos) tal como, por exemplo, nucleotídeos marcados com isótopo e/ou fluorescência. Moléculas de mRNA marcadas desempenham, por exemplo, um papel importante no estudo da conformação intracelular de moléculas de RNA e DNA.

[0020] Em uma modalidade preferida, o RNA, preferivelmente o

mRNA, é uma molécula que contém nucleotídeos/ribonucleotídeos modificados. Além dos quatro ribonucleotídeos clássicos, a saber, adenosina, guanossina, citidina e uridina, existem inúmeros análogos de cada uma dessas nucleobases. Algumas vezes em toda parte e na literatura, esses análogos, ou moléculas de RNA/mRNA que incluem um ou mais desses análogos, são referidos como modificados em termos da presente invenção (por exemplo, nucleotídeos modificados ou ribonucleotídeos modificados). Alguns análogos diferem das nucleobases canônicas anteriores, mas ainda podem existir na natureza. Outros análogos são de ocorrência não natural. Qualquer tipo de análogo é contemplado.

[0021] Modificações preferidas são apresentadas na Tabela seguinte (Tabela 1):

Nome	Modificação de base (posição 5)	Modificação de açúcar (posição 2')	Naturalmente em mRNA
Uridina			
5-metiluridina 5'-trifosfato (m5U)	CH ₃	-	não
5-iodouridina 5'-trifosfato (I5U)	I	-	não
5-bromouridina 5'-trifosfato (Br5U)	Br	-	não
2-tiouridina 5'-trifosfato (S4U)	S (na posição 2)	-	não
4-tiouridina 5'-trifosfato (S2U)	S (na posição 4)	-	não
2'-metil-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (U2'm)	-	CH ₃	sim
2'-amino-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (U2'NH ₂)	-	NH ₂	não
2'-azido-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (U2'N ₃)	-	N ₃	não
2'-flúor-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (U2'F)	-	F	não
Pseudouridina (ψ)	-	-	sim
N1-metil-pseudouridina (N1mΨ)	-	-	não
Citidina			
5-metilcitidina 5'-trifosfato (m5C)	CH ₃	-	sim
5-iodocitidina 5'-trifosfato (I5U)	I	-	não
5-bromocitidina 5'-trifosfato (Br5U)	Br	-	não
2-tiocitidina 5'-trifosfato (S2C)	S (na posição 2)	-	não
2'-metil-2'-deoxicitidina 5'-trifosfato (C2'm)	-	CH ₃	sim
2'-amino-2'-deoxicitidina 5'-trifosfato (C2'NH ₂)	-	NH ₂	não
2'-azido-2'-deoxicitidina 5'-trifosfato (C2'N ₃)	-	N ₃	não
2'-flúor-2'-deoxicitidina 5'-trifosfato (C2'F)	-	F	não
Adenosina			
N6-metiladenosina 5'-trifosfato (m6A)	CH ₃ (na posição 6)	-	sim
N1-metiladenosina 5'-trifosfato (m1A)	CH ₃ (na posição 1)	-	não
2'-O-metiladenosina 5'-trifosfato (A2'm)	-	CH ₃	sim
2'-amino-2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato (A2'NH ₂)	-	NH ₂	não
2'-azido-2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato (A2'N ₃)	-	N ₃	não
2'-flúor-2'-deoxiadenosina 5'-trifosfato (A2'F)	-	F	não
Guanosina			

N1-metilguanosina 5'-trifosfato (m1G)	CH ₃ (na posição 1)	-	não
2'-O-metilguanosina 5'-trifosfato (G2'm)	-	CH ₃	sim
2'-amino-2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato (G2'NH ₂)	-	NH ₂	não
2'-azido-2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato (G2'N ₃)	-	N ₃	não
2'-flúor-2'-deoxiguanosina 5'-trifosfato (G2'F)	-	F	não

[0022] Para o RNA, preferivelmente o mRNA, de acordo com a invenção, todo e qualquer nucleotídeo de uridina e nucleotídeo de citidina pode cada qual ser modificado da mesma forma ou em vez disso uma mistura de nucleotídeos modificado pode ser usada para cada a. Os nucleotídeos modificados podem ter modificações de ocorrência natural ou não natural. Uma mistura de vários nucleotídeos modificados pode ser usada. Assim, por exemplo, uma parte dos nucleotídeos modificados pode ter modificações naturais, enquanto uma outra parte tem modificações de ocorrência não natural ou uma mistura de nucleotídeos modificados de ocorrência natural e/ou modificados de ocorrência não natural pode ser usada. Também, uma parte dos nucleotídeos modificados pode ter uma modificação de base e uma outra parte uma modificação de açúcar. Da mesma maneira, é possível que todas as modificações sejam modificações de base ou todas as modificações sejam modificações de açúcar ou qualquer mistura adequada das mesmas. Por variação das modificações, a estabilidade e/ou duração de ação do RNA, preferivelmente do mRNA, de acordo com a invenção pode ser seletivamente ajustada.

[0023] Em uma modalidade da invenção, pelo menos duas diferentes modificações são usadas para um tipo de nucleotídeo, onde um tipo dos nucleotídeos modificados tem um grupo funcional por meio do qual grupos adicionais podem ser afixados. Nucleotídeos com diferentes grupos funcionais podem também ser usados, a fim de prover sítios de ligação para a afixação de diferentes grupos. Assim, por exemplo, uma parte dos nucleotídeos modificados pode carregar um grupo azido, um grupo amino, um grupo hidróxi, um grupo tiol ou algum outro grupo reativo que é adequado para reação em condições predefinidas. O grupo funcional pode também ser

de maneira tal que ele possa em certas condições ativer um grupo naturalmente presente capaz de ligação, de modo que as moléculas com funções podem ser acopladas. Nucleotídeos que são modificados de modo que eles provejam sítios de ligação podem também ser introduzidos como modificações de adenosina ou guanosina. A seleção das modificações adequadas particulares e a seleção dos sítios de ligação a ser feitas disponíveis depende de quais grupos devem ser introduzidos e com qual frequência essas devem estar presentes. Assim, o teor dos nucleotídeos providos com grupos funcionais e/ou de ativação depende de quão alto deve ser o teor de grupos a serem acoplados e pode facilmente ser determinado por um versado na técnica. Como uma regra, o teor de nucleotídeos modificado com grupos funcionais e/ou de ativação, se presentes, é 1 a 25% dos nucleotídeos modificados. Os versados na técnica podem se necessário determinar os grupos mais adequados em cada caso e o teor ideal dos mesmos por experimentos de rotina.

[0024] Em uma modalidade preferida, o RNA, preferivelmente o mRNA de acordo com a invenção, é distinguido em que uridinas modificadas são selecionadas de 2-tiouridina, 5-metiluridina, pseudouridina, 5-metiluridina 5'-trifosfato (m5U), 5-idouridina 5'-trifosfato (I5U), 4-tiouridina 5'-trifosfato (S4U), 5-bromouridina 5'-trifosfato (Br5U), 2'-metil-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (U2'm), 2'-amino-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (U2'NH₂), 2'-azido-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (U2'N₃) e 2'-flúor-2'-deoxiuridina 5'-trifosfato (U2'F).

[0025] Em uma outra modalidade preferida, o RNA, preferivelmente o mRNA de acordo com a invenção, é distinguido em que citidinas modificadas são selecionadas de 5-metilcitidina, 3-metilcitidina, 2-tiocitidina, 2'-metil-2'-deoxicitidina 5'-trifosfato (C2'm), 2'-amino-2'-deoxicitidina 5'-trifosfato (C2'NH₂), 2'-flúor-2'-deoxicitidina 5'-trifosfato (C2'F), 5-iodocitidina 5'-trifosfato (I5U), 5-bromocitidina 5'-trifosfato

(Br5U) e 2'-azido-2'-deoxicitidina 5'-trifosfato (C2'N3).

[0026] Em uma modalidade preferida, o mRNA é um mRNA que contém uma combinação de nucleotídeos modificados e não modificados. Preferivelmente, ele é um mRNA contendo uma combinação de nucleotídeos modificados e não modificados como descrito no documento WO2011/012316. É reportado que o mRNA descrito no mesmo apresenta uma estabilidade aumentada e imunogenicidade diminuída. Em uma modalidade preferida, em um mRNA modificado como esse 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 prefere-se que os nucleotídeos de citidina modificados sejam resíduos de 5-metilcitidina e os nucleotídeos de uridina modificados sejam resíduos de 2-tiouridina. Acima de tudo preferivelmente, o teor de nucleotídeos de citidina modificados e o teor dos nucleotídeos de uridina modificados são 25%, respectivamente.

[0027] Em certas outras modalidades, em um RNA modificado como esse, preferivelmente mRNA, 5 a 50% das citidinas são análogas de C e 5 a 50% das uridinas são análogos de U. Em certas modalidades, em um RNA modificado como esse, preferivelmente mRNA, 5 a 40% das citidinas são análogas de C e 5 a 40% das uridinas são análogos de U. Em certas modalidades, em um RNA modificado como esse, preferivelmente mRNA, 5

a 30% das citidinas são análogas de C e 5 a 30% das uridinas são análogos de U. Em certas modalidades, em um RNA modificado como esse, preferivelmente mRNA, 10 a 30% das citidinas são análogas de C e 10 a 30% das uridinas são análogos de U. Em certas modalidades, em um RNA modificado como esse, preferivelmente mRNA, 5 a 20% das citidinas são análogas de C e 5 a 20% das uridinas são análogos de U. Em certas modalidades, em um RNA modificado como esse, preferivelmente mRNA, 5 a 10% dos nucleotídeos de citidina e 5 a 10% dos nucleotídeos de uridina são modificados. Em certas modalidades, em um RNA modificado como esse, preferivelmente mRNA, 25% dos nucleotídeos de citidina e 25% dos nucleotídeos de uridina são modificados. Em certas modalidades, os nucleotídeos contendo adenosina e guanosina podem ser não modificados. Em certas modalidades, os nucleotídeos de adenosina e guanosina podem ser não modificados ou parcialmente modificados, e eles estão preferivelmente presentes em forma não modificada.

[0028] Como notado anteriormente, em certas modalidades, análogos de U se referem a um único tipo de análogo de U. Em certas modalidades, análogos de U se referem a dois ou mais tipos de análogos de U. Em certas modalidades, análogos de C se referem a um único tipo de análogo de C. Em certas modalidades, análogos de C se referem a dois ou mais tipos de análogos de C.

[0029] Em certas modalidades, a porcentagem de citidinas em um RNA, preferivelmente um mRNA, que são análogos de citidina não é a mesma da porcentagem de uridinas no RNA preferivelmente no mRNA que são análogos de uridina. Em certas modalidades, a porcentagem de análogos de citidina é menor que a porcentagem de análogos de uridina. Como notado anteriormente, isso pode ser na presença ou na ausência de análogos de adenosina e guanosina mas, em certas modalidades, é na ausência de análogos de adenosina e análogos de guanosina. Em certas modalidades, RNA,

preferivelmente o mRNA da descrição, compreende menos que 15%, menos que 10%, menos que 5% ou menos que 2% de análogos de adenosina, análogos de guanosina ou ambos.

[0030] Em certas modalidades, um RNA, preferivelmente um mRNA da presente invenção, compreende análogos de citidina e análogos de uridina, e 5 a 20% das citidinas são análogos de citidina e 25 a 45% das uridinas são análogos de uridina. Em outras palavras, o RNA, preferivelmente o mRNA compreende citidinas modificadas e não modificadas e uridinas modificadas e não modificadas, e 5 a 20% das citidinas compreendem análogos de citidina enquanto 25 a 45% das uridinas compreendem análogos de uridina. Em outras modalidades, o RNA, preferivelmente o mRNA compreende 5 a 10% de análogos de citidina e 30 a 40% de análogos de uridina, tal como 7 a 9% de análogos de citidina, tal como cerca de 7, 7,5 ou 8% e, tal como 32 a 38% de análogos de uridina, tal como cerca de 33, 34, 35, 36%.

[0031] Em certas modalidades, quaisquer dos análogos de uridina e análogos de citidina descritos aqui podem ser usados, opcionalmente excluindo pseudouridina. Em certas modalidades, o análogo de citidina compreende ou consiste em (por exemplo, no caso de consistir em, ele é o único tipo de análogo usado) 5-iodocitidina e o análogo de uridina compreende ou consiste em (por exemplo, no caso de consistir em, ele é o único tipo de análogo usado) 5-iodouridina.

[0032] Em certas modalidades de qualquer do exposto, a porcentagem de análogos de um dado nucleotídeo se refere a porcentagem de entrada (por exemplo, a porcentagem de análogos em uma reação de partida, tal como uma reação de transcrição in vitro de partida). Em certas modalidades de qualquer do exposto, a porcentagem de análogos de um dado nucleotídeo se refere a saída (por exemplo, a porcentagem em um composto sintetizado ou transcrito). Ambas as opções são igualmente contempladas.

[0033] O RNA, preferivelmente as moléculas de mRNA da presente

invenção, pode ser produzido recombinantemente em sistemas *in vivo* por métodos conhecidos por um versado na técnica.

[0034] Alternativamente, o RNA modificado, preferivelmente as moléculas de mRNA da presente invenção podem ser produzidas em um sistema *in vitro* usando, por exemplo, um sistema de transcrição *in vitro* que é conhecido por um versado na técnica. Um sistema de transcrição *in vitro* capaz de produzir RNA, preferivelmente mRNA, exige uma mistura de entrada de trifosfatos de nucleosídeo modificado e não modificado para produzir RNA modificado, preferivelmente moléculas de mRNA com as propriedades desejadas da presente invenção. Em certas modalidades, 5 a 50% das citidinas são análogos de citidina em uma mistura de entrada como essa e 5 a 50% das uridinas são análogos de uridina em uma mistura de entrada como essa. Em certas modalidades, 5 a 40% das citidinas são análogos de citidina em uma mistura de entrada como essa e 5 a 40% das uridinas são análogos de uridina em uma mistura de entrada como essa. Em certas modalidades, 5 a 30% das citidinas são análogos de citidina em uma mistura como essa e 5 a 30% das uridinas são análogos de uridina em uma mistura de entrada como essa. Em certas modalidades, 5 a 30% das citidinas são análogos de citidina em tal mistura e 10 a 30% das uridinas são análogos de uridina em tal mistura. Em certas modalidades, 5 a 20% das citidinas são análogos de citidina em uma mistura de entrada como essa e 5 a 20% das uridinas são análogos de uridina em uma mistura de entrada como essa. Em certas modalidades, 5 a 10% das citidinas são análogos de citidina em uma mistura de entrada como essa e 5 a 10% das uridinas são análogos de uridina em uma mistura de entrada como essa. Em certas modalidades, 25% das citidinas são análogos de citidina em uma mistura de entrada como essa e 25% das uridinas são análogos de uridina em uma mistura de entrada como essa. Em certas modalidades, a mistura de entrada não compreende análogos de adenosina e/ou guanossina. Em outras modalidades, opcionalmente, a

mistura de entrada compreende um ou mais análogos de adenosina e/ou guanosina (ou nenhum de qualquer ou ambos).

[0035] Em certas modalidades, a porcentagem de citidinas em uma mistura de entrada que são análogos de citidina não é a mesma da porcentagem de uridinas em uma mistura de entrada que são análogos de uridina. Em certas modalidades, a porcentagem de análogos de citidina em uma mistura de entrada é menor que a porcentagem de análogos de uridina em uma mistura de entrada. Como notado anteriormente, isso pode ser na presença ou na ausência de análogos de adenosina e guanosina na mistura de entrada mas, em certas modalidades, é na ausência de análogos de adenosina e análogos de guanosina na mistura de entrada.

[0036] Em certas modalidades, uma mistura de entrada de nucleotídeos para um sistema de transcrição in vitro que produz um RNA, preferivelmente mRNA, da presente invenção compreende análogos de citidina e análogos de uridina, e 5 a 20% das citidinas da mistura de entrada são análogos de citidina e 25 a 45% das uridinas da mistura de entrada são análogos de uridina. Em outras palavras, a mistura de entrada compreende citidinas modificadas e não modificadas e uridinas modificadas e não modificadas, e 5 a 20% das citidinas da mistura de entrada compreendem análogos de citidina enquanto 25 a 45% das uridinas da mistura de entrada compreendem análogos de uridina. Em outras modalidades, a mistura de entrada compreende 5 a 10% de análogos de citidina e 30 a 40% de análogos de uridina, tal como 7 a 9% de análogos de citidina, tal como 7, 7,5 ou 8% e, tal como 32 a 38% de análogos de uridina, tal como 33, 34, 35, 36%.

[0037] Em certas modalidades, quaisquer dos análogos de uridina e análogos de citidina descritos aqui podem ser usados, opcionalmente excluindo pseudouridina. Em certas modalidades, o análogo de citidina compreende ou consiste em (por exemplo, ele é o único tipo de análogo C usado) 5-iodocitidina e o análogo de uridina compreende ou consiste em (por

exemplo, ele é o único tipo de análogo U usado) 5-iodouridina.

[0038] Análogos de exemplo são descritos nas Tabelas anteriores. Deve-se entender que, para poli-ribonucleotídeos modificados que codificam o polipeptídeo desejado (módulo (a)), os análogos e nível de modificação são, a menos que indicado de outra forma, considerados cruzar todo o poli-ribonucleotídeo que codifica o polipeptídeo desejado (módulo (a)), incluindo regiões não traduzidas 5' e 3' (por exemplo, o nível de modificação é com base em razões de entrada de análogos em uma reação de transcrição *in vitro* de maneira tal que análogos possam ser incorporados nas posições que são transcritas).

[0039] Além disso, o RNA modificado, preferivelmente moléculas de mRNA, pode ser quimicamente sintetizado, por exemplo, por síntese química convencional em um sintetizador sequência de nucleotídeos automatizado usando um suporte de fase sólida e técnicas padrões ou por síntese química das respectivas sequências de DNA e transcrição *in vitro* ou *in vivo* subsequente das mesmas.

[0040] 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'.

[0041] Em geral, efeitos terapêuticos podem ser obtidos pela interação do ácido ribonucleico 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 ribonucleicos (preferivelmente mRNAs) em células pode ser destinada a levar à expressão

de sequências de nucleotídeos tais como genes compreendidos no ácido ribonucleico (preferivelmente o mRNA), 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 ácido nucleico endógeno 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 ribonucleico exógeno introduzido (preferivelmente um mRNA). Sobre-expressão de ácidos ribonucleicos exógenos introduzidos (preferivelmente mRNAs) 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 ribonucleicos exógenos introduzidos (preferivelmente mRNAs) pode também ser destinada a fazer com que o produto da expressão interaja ou interfira com qualquer processo celular endógeno tais como a regulação de expressão genética, transdução de sinal e outros processos celulares. A sobre-expressão de ácidos ribonucleicos exógenos introduzidos (preferivelmente mRNAs) 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 feita para residir. Exemplos são a modificação genética de células que apresentam antígeno tais como células dendríticas a fim de fazê-las apresentar 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 ribonucleicos exógenos introduzidos

(preferivelmente mRNAs) 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.

[0042] 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, quimeroplastos, 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 do lado de 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 partículas para uso no contexto da presente invenção com ácidos nucleicos como agente terapeuticamente ativo podem ser úteis para todos os propósitos descritos anteriormente.

[0043] Como mencionado anteriormente, o RNA, preferivelmente o mRNA, pode conter uma sequência de ribonucleotídeos que codifica uma proteína ou fragmento da mesma, cuja função na célula ou nas vizinhanças 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 da qual 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.

[0044] Certamente, nos últimos anos, RNA (em particular, mRNA) tem ficado de forma crescente relevante como uma nova entidade de fármaco. Oposto ao produto terapêutico genético baseado em DNA, mRNA não precisa ser transportado para o núcleo, mas é diretamente traduzido em proteína no citoplasma (J Control Release, 2011, 150:238-247, e Eur J Pharm Biopharm, 2009, 71:484-489).

[0045] Além disso, inúmeros distúrbios genéticos, causados pela mutação de um único gene são conhecidos e candidatos para RNA,

preferivelmente abordagens terapêuticas de mRNA. Distúrbios causados por mutações de único gene, como fibrose cística, hemofilia e muitos outros, podem ser dominantes ou recessivos com respeito à probabilidade de que um certo traço aparecerá na descendência. Embora um alelo dominante manifeste um fenótipo em indivíduos que têm apenas uma cópia do alelo, para um alelo recessivo o indivíduo deve ter duas cópias, um de cada pai para ficar manifesto. Ao contrário, distúrbios poligenéticos são causados por dois ou mais genes e a manifestação da respectiva doença é frequentemente fluente e associada a fatores ambientais. Exemplos para distúrbios poligenéticos são hipertensão, nível de colesterol elevado, câncer, distúrbios neurodegenerativos, enfermidade mental e outros. Também nesses casos RNA terapêutico, preferivelmente o mRNA, representando um ou mais desses genes pode ser benéfico para esses pacientes. Além disso, um distúrbio genético não deve ter sido passado pelos genes dos pais, mas pode também ser causado por novas mutações. Também nesses casos RNA terapêutico, preferivelmente o mRNA, representando a sequência genética correta pode ser benéfico para os pacientes.

[0046] Um catálogo online atualmente com 22.993 entradas de Genes Humanos e Distúrbios Genéticos junto com seus respectivos genes e uma descrição de seus fenótipos são disponíveis no ONIM (Online Mendelian Inheritance in Man) webpage (<http://onim.org>); sequências de cada qual são disponíveis pela base de dados Uniprot (<http://www.uniprot.org>). Como exemplos não limitantes, **Tabela 2** a seguir lista algumas doenças congênitas, e o(s) gene(s) correspondente(s). Devido ao alto grau de interação de caminhos de sinalização celular, a mutação de um certo gene causa uma pluralidade de sintomas patogênicos, dos quais apenas a característica é listada na **Tabela 2**.

[0047] Em algumas modalidades da presente invenção, a proteína terapêutica que é codificada pelo RNA, preferivelmente pelo mRNA, da

presente invenção é escolhida das proteínas celulares listadas na **Tabela 2**. Assim, a molécula do RNA, preferivelmente do mRNA, da invenção pode codificar uma proteína celular terapêutica, em que a proteína terapêutica codificada é uma listada na **Tabela 2** ou um homólogo da mesma.

[0048] Em uma outra modalidade da presente invenção, a proteína terapêutica que é codificada pelo RNA, preferivelmente o mRNA, da presente invenção é escolhida pelas proteínas secretadas listadas na **Tabela 2**. Assim, o RNA, preferivelmente o mRNA, da presente invenção pode codificar uma proteína de fusão terapêutica, em que a proteína terapêutica codificada ou um homólogo da mesma é uma listada na **Tabela 2** e a segunda proteína é um peptídeo sinal que permite a secreção da proteína terapêutica. Um peptídeo sinal é uma sequência de aminoácidos curta, tipicamente de 5 a 30 aminoácidos de comprimento, presente no término N da dita proteína terapêutica e que leva a proteína de fusão em direção ao caminho secretória da célula por meio de certas organelas (isto é, o retículo endoplasmático, o aparelho de golgi ou os endossomos). Assim, tal proteína de fusão é secretada da célula ou de uma organela celular ou inserida em uma membrana celular (por exemplo, proteínas transmembranas multiabrangentes) em um compartimento celular ou na superfície da célula.

[0049] Assim, em modalidades preferidas da presente invenção o RNA, preferivelmente o mRNA, da presente invenção pode codificar, mas não se limitando às seguintes proteínas dos genes que causam, predisõem ou protegem das doenças. Exemplos não limitantes de tais distúrbios que podem ser tratados (ou prevenidos) incluem aqueles em que os ditos polipeptídeo, proteína ou peptídeo são selecionados do grupo que consiste nos esboçados na **Tabela 2** seguinte.

[0050] Em algumas modalidades, a sequência codificante do RNA, preferivelmente do mRNA, da presente invenção pode ser transcrita e traduzida em uma proteína de comprimento parcial ou total compreendendo

atividade celular a um nível igual ou maior que o da proteína nativa. Em algumas modalidades, o RNA, preferivelmente o mRNA, da presente invenção 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 que consiste nos esboçados na **Tabela 2** seguinte. O RNA, preferivelmente o mRNA, mais especificamente a sequência codificante do mesmo, pode ser usado para expressar uma proteína de comprimento parcial ou total com atividade celular a um nível igual ou menor que o da proteína nativa. Isso pode permitir o tratamento de doenças para as quais a administração de uma molécula de RNA pode ser indicada.

Tabela 2: 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 (forma 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 supraavicular	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 -Cetoacídose e morte nos primeiros meses se não tratada	Alfa-desidrogenase de cadeia ramificada (BCKDH)
Síndrome de Menk	Capacidade reduzida de absorver 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 dos condrócitos	Receptor do fator de crescimento do fibroblasto 3 (FGF3R),
Síndrome de Charcot-Marie-Tooth e sua mais grave forma Síndrome de Dejerina-Sottas	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 cruzada de reparo por excisão de grupo 8 (ERCC8)
Displasia condroectodérmica	Má formação de ossos e polidactilia	EVC, autossômica recessiva
Displasia distrófica (DTD)	Mãos malformadas, defeito do transportador de sulfato	Gene DTDST
Distrofia muscular de Duchenne	Alargamento de tecido do 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 impedido 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 uma 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 de tensoativo (vários tipos)	Recém-nascidos são de peso corpóreo normal, mas nenhum consegue 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 lisossômico		
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 (vida 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, esfingolipídios)	Glucocerebrosidase, autossômica recessiva,
Síndrome de Hunter	Acúmulo de mucopolissacarídeos	L-iduronossulfato sulfatase, X-cromossômica recessivo
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 junctional, 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 pseudojuntal (EBR4), Desmoplacina (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

[0051] A **Tabela 2** anterior mostra exemplos de genes nos quais um defeito leva a uma doença que pode ser tratada com o RNA, preferivelmente o mRNA da presente invenção, em que o RNA, preferivelmente o mRNA da presente invenção, compreende uma sequência de ribonucleotídeos que codifica uma versão intacta da proteína ou um fragmento funcional da mesma do gene defeituoso do supradescrito. Em modalidades particularmente preferidas, doenças hereditárias podem ser mencionadas que, por exemplo, afetam os pulmões, tais como deficiência de SPB (proteína B de tensoativo), deficiência de ABCA3, fibrose cística e deficiência de α 1-antitripsina, ou que afetam proteínas plasmáticas (por exemplo, hemocromatose congênita (deficiência de hepcidina), púrpura trombocitopênica trombótica (TPP, deficiência de ADAMTS 13) e causam defeitos de coagulação (por exemplo, hemofilia a e b) e defeitos de complemento (por exemplo, deficiência de proteína C), defeitos imunes tal como, por exemplo, SCID (causado por mutações em diferentes genes tais como: RAG1, RAG2, JAK3, IL7R, CD45, CD3 δ , CD3 ϵ) ou por deficiências devido a falta de adenosina desaminase, por exemplo, (ADA-SCID), granulomatose séptica (por exemplo, causada por mutações do gene gp-91-phox, do gene p47-phox, do gene p67-phox ou do gene p33-phox) e doenças de armazenamento como doença de Gaucher, doença de Fabry, doença de Krabbe, MPS I, MPS II (síndrome de Hunter), MPS VI, doença de armazenamento de glicogênio tipo II ou mucopolissacaridoses.

[0052] Outros distúrbios para os quais o RNA, preferivelmente o

mRNA, da presente invenção pode ser útil incluem distúrbios tais como atrofia muscular espinhal relacionada a SMN1 (SMA); esclerose amiotrófica lateral (ALS); galactosemia relacionada a GALT; Fibrose Cística (CF); distúrbios relacionados a SLC3A1 incluindo cistinúria; distúrbios relacionados a COL4A5 incluindo síndrome de Alport; deficiências de galactocerebrosidase; adrenoleucodistrofia e adrenomieloneuropatia ligadas a Xa e adrenomieloneuropatia; ataxia de Friedreich; doença de Pelizaeus-Merzbacher; TSC1 e esclerose tuberosa relacionada a TSC2; síndrome de Sanfilippo B (MPS IIIB); cistinose relacionada a CTNS; os distúrbios relacionados a FMR1 que incluem síndrome do X frágil, - Síndrome de Tremor/Ataxia associado a X frágil e Síndrome da Falha Ovariana Prematura X frágil; Síndrome de Prader-Willi; telangiectasia hemorrágica hereditária (AT); doença de Niemann-Pick Tipo C1; as doenças relacionadas a lipofuscinoses Ceróides Neurais incluindo Lipofuscinose Ceróide Neuronal Juvenil (JNCL), doença Batten Juvenil, doença de Santavuori-Haltia, doença de Jansky-Bielschowsky, e deficiências de PTT-1 e TPP1; EIF2B1, EIF2B2, EIF2B3, EIF2B4 e ataxia na infância relacionada a EIF2B5 com hipomielinização/evanescente substância branca do sistema nervoso central; Ataxia Episódica Tipo 2 relacionada a CACNA1A e CACNB4; os distúrbios relacionados a MECP2 incluindo Síndrome de Rett Clássica, Encefalopatia Neonatal Grave relacionada a MECP2 e Síndrome de PPM-X; Síndrome de Rett Atípica relacionada a CDKL5; doença de Kennedy (SBMA); arteriopatia dominante autossômica cerebral relacionada a Notch-3 com infartos subcorticais e leucoencefalopatia (CADASIL); distúrbios convulsivos relacionados a SCN1A e SCN1B; os distúrbios relacionados a G Polimerase que incluem síndrome de Alpers-Huttenlocher, neuropatia atáxica sensorial relacionada a POLG, disartria, e oftalmoparese, e oftalmoplegia externa progressiva autossômica dominante e recessiva com deleções de DNA mitocondrial; hipoplasia adrenal ligada a X; agamaglobulinemia ligada a X;

doença de Fabry; e doença de Wilson.

[0053] Em todas essas doenças, uma proteína, por exemplo, uma enzima, é defeituosa, que pode ser tratada por tratamento com o RNA, preferivelmente o mRNA, que codifica qualquer uma das proteínas anteriores da presente invenção, que torna a proteína codificada pelo gene defeituoso ou um fragmento funcional do mesmo disponível. Terapias de substituição de transcrito/terapias de substituição de enzima não afetam o defeito genético subjacente, 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).

[0054] Assim, exemplos não limitantes de proteínas que podem ser codificadas pelo mRNA da presente invenção são eritropoietina (EPO), hormônio do crescimento (somatotropina, hGH), regulador de condutância de transmembrana da fibrose cística (CFTR), fatores de crescimento tais como GM-SCF, G-CSF, MPS, proteína C, hepcidina, ABCA3 e proteína B de tensoativo. Exemplos adicionais de doenças que podem ser tratadas com o RNA de acordo com a invenção são hemofilia A/B, doença de Fabry, CGD, ADAMTS13, doença de Hurler, A- γ -globulinemia mediada por cromossomo X, imunodeficiência relacionada a adenosina deaminase e síndrome da angústia respiratória no recém-nascido, que é ligada com SP-B. Particularmente de forma preferível, o RNA, preferivelmente o mRNA, de acordo com a invenção contém a sequência codificante para proteína B de tensoativo (SP-B) ou para eritropoietina. Exemplos adicionais de proteínas que podem ser codificadas pelo RNA, preferivelmente o mRNA, da presente invenção de acordo com a invenção são fatores de crescimento tais como fatores do hormônio do crescimento humano hGH, BMP-2 ou angiogênese.

[0055] Alternativamente, o RNA, preferivelmente o mRNA, pode conter uma sequência de ribonucleotídeos que codifica um anticorpo de

comprimento total ou um anticorpo menor (por exemplo, cadeias tanto pesadas quanto leves) que pode ser usado em ambientes terapêuticos, por exemplo, para conferir imunidade a um sujeito. Anticorpos correspondentes e sua(s) aplicação(ões) terapêutica(s) são conhecidos na técnica.

[0056] Em uma outra modalidade, o RNA, preferivelmente o mRNA pode codificar um anticorpo monoclonal ou policlonal funcional, que pode ser útil para alvejar e/ou inativar um alvo biológico (por exemplo, uma citocina estimulatória tal como fator de necrose tumoral). Similarmente, uma sequência de RNA, preferivelmente o mRNA pode codificar, por exemplo, anticorpos de fator antinefrótico funcionais úteis para o tratamento de glomerulonefrite tipo II membranoproliferativa ou síndrome urêmica hemolítica aguda, ou alternativamente pode codificar anticorpos de fator de crescimento endotelial anti-vascular (VEGF) úteis para o tratamento de doenças mediadas por VEGF, tal como câncer.

[0057] Alternativamente, o RNA, preferivelmente o mRNA, pode conter uma sequência de ribonucleotídeos que codifica um antígeno que preferivelmente pode ser usado em ambientes terapêuticos.

[0058] Em uma outra modalidade, o RNA, preferivelmente o mRNA, pode conter uma sequência de ribonucleotídeos que codifica um polipeptídeo ou uma proteína que pode ser usada nas tecnologias de edição de genoma. Edição de genoma é um tipo de engenharia genética na qual o DNA é inserido, deletado ou substituído no genoma de um organismo usando nucleases. Essas nucleases criam quebra específica do sítio em locais desejados no genoma. As quebras induzidas são reparadas por união de extremidade não homóloga ou recombinação homóloga, resultando em mutações alvejadas no genoma, por meio disso “editando” o genoma. As quebras podem ser tanto quebras de fita única quanto quebras de fita dupla (DSBs) embora quebras de fita dupla (DSBs) sejam preferidas. Inúmeros sistemas de edição de genoma utilizando diferentes polipeptídeos ou proteínas

são conhecidos na técnica, isto é, por exemplo, o sistema CRISPR-Cas, meganucleases, nucleases de dedo de zinco (ZFNs) e nucleases baseadas em efector do tipo ativador de transcrição (TALEN). Métodos para modificar geneticamente o genoma são revistos em *Trends in Biotechnology*, 2013, 31 (7), 397-405.

[0059] Assim, em uma modalidade preferida, o RNA, preferivelmente o mRNA, pode conter uma sequência de ribonucleotídeos que codifica um polipeptídeo ou proteína da família da proteína Cas (proteína associada a CRISPR), preferivelmente Cas9 (proteína associada a CRISPR9). Proteínas da família da proteína Cas, preferivelmente Cas9, podem ser usadas em métodos baseados em CRISPR/Cas9 e/ou tecnologias de edição de genoma CRISPR/Cas9. Os sistemas CRISPR-Cas para edição de genoma, regulação e alvejamento são revistos em *Nat. Biotechnol.*, 2014, 32(4):347-355.

[0060] Em uma outra modalidade preferida, o RNA, preferivelmente o mRNA, pode conter uma sequência de ribonucleotídeos que codifica uma meganuclease. Meganucleases são endodeoxiribonucleases que, ao contrário de endodeoxiribonucleases “convencionais”, reconhecem um grande sítio de reconhecimento (por exemplo, uma sequência de DNA de fita dupla de 12 a 40 pares de base). Em decorrência disso, o respectivo sítio ocorre apenas algumas vezes, preferivelmente apenas uma vez, em qualquer dado genoma. Meganucleases são, portanto, considerados as enzimas mais específicas de restrição de ocorrência natural e, dessa maneira, são ferramentas adequadas nas tecnologias de edição de genoma.

[0061] Em uma outra modalidade preferida, o RNA, preferivelmente o mRNA, contém uma sequência de ribonucleotídeos que codifica uma nuclease de dedo de zinco (ZFN). ZFNs são enzimas de restrição artificiais geradas fundindo um domínio de ligação de DNA de dedo de zinco a um domínio de clivagem de DNA. Domínios de dedo de zinco podem ser modificados geneticamente para alvejar sequências de DNA desejadas

específicas e isso permite que nucleases dedo de zinco alveje sequências exclusivas nos genomas complexos. Tirando vantagem do maquinário de reparo de DNA endógeno, ZFNs podem ser usadas para alterar precisamente o genoma de organismos superiores e são, portanto, ferramentas adequadas nas tecnologias de edição de genoma.

[0062] Em uma outra modalidade preferida, o RNA, preferivelmente o mRNA, pode conter uma sequência de ribonucleotídeos que codifica uma nuclease de efector do tipo ativador de transcrição (TALEN). TALENs são enzimas de restrição que podem ser modificadas geneticamente para cortar sequências de DNA específicas. TALENs são proteínas de fusão em que um domínio de ligação de DNA efector TAL é fundido a um domínio de clivagem de DNA de uma nuclease. Efectores do tipo ativador de transcrição (TALEs) podem ser modificados geneticamente para ligar praticamente qualquer sequência de DNA desejada. Assim, quando combinado com uma nuclease, o DNA pode ser cortado em locais desejados específicos.

[0063] Alternativamente ao exposto, o RNA contém uma sequência de ribonucleotídeos que não deve ser expressa como uma proteína ou um polipeptídeo. Assim, o termo RNA não deve se apenas entendido como qualquer molécula de polinucleotídeo que, se introduzida em uma célula, é traduzível em um polipeptídeo/proteína ou fragmento do mesmo. Em vez disso, também é contemplado que o RNA contém uma sequência de ribonucleotídeos que é apenas transcrita para um RNA (funcional), em que o dito RNA é o produto final (e, dessa maneira, não precisa ser traduzido). Nesse contexto, considera-se que o RNA contém uma sequência de ribonucleotídeos que preferivelmente provê a informação genética para uma sequência siRNA ou uma outra sequência de ribonucleotídeos desejada.

[0064] Deve-se entender que as partículas para uso no contexto da presente invenção podem compreender um único tipo de RNA, mas podem alternativamente compreender uma combinação de dois ou mais tipos de

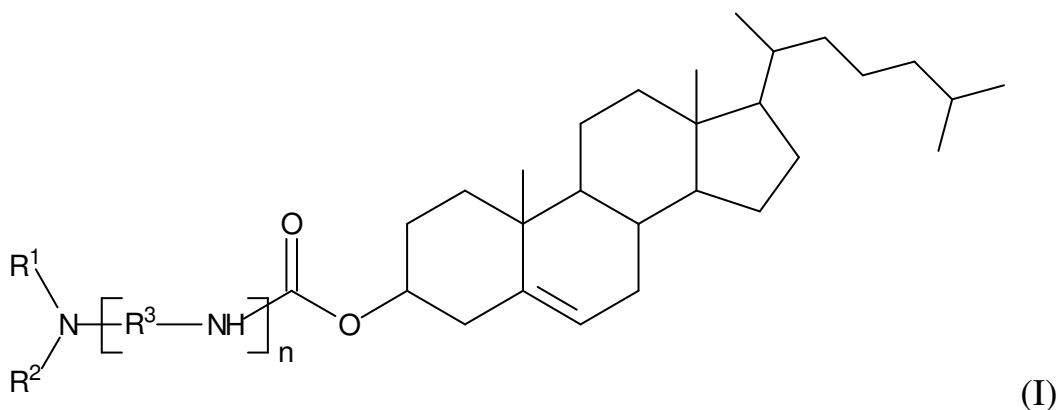
RNA, por exemplo, na forma de partículas compreendendo dois ou mais tipos de RNA em partículas únicas, ou na forma de uma mistura de partículas que diferem no tipo de RNA contido nas mesmas.

Composição de lipídio

[0065] A composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção e a composição sólida de acordo com o terceiro aspecto da invenção compreendem partículas que compreendem RNA e uma composição de lipídio.

[0066] A composição de lipídio compreende (i-a) um derivado de colesterol da fórmula (I) ou um sal do mesmo, (i-b) um fosfoglicerídeo da fórmula (II) ou um sal do mesmo, e (i-c) um fosfoglicerídeo peguado da fórmula (III) ou um sal do mesmo. Componentes de lipídio adicionais podem estar presentes, mas preferivelmente os componentes (i-a), (i-b) e (i-c) são os únicos componentes de lipídio na composição de lipídio contidos nas partículas.

[0067] O componente (i-a) da composição de lipídio é um derivado de colesterol da fórmula (I) ou um sal do mesmo:



em que

n é 0 ou 1,

R^1 é um grupo $-(CH_2)_q-NH_2$ ou um grupo $-(CH_2)_r-NH-(CH_2)_s-NH_2$,

em que q , r e s são independentemente um número inteiro de 2 a 6,

R^2 é um grupo $-(CH_2)_t-NH_2$ ou um grupo $-(CH_2)_u-NH-(CH_2)_w-NH_2$,

em que t, u e w são independentemente um número inteiro de 2 a 6,

R^3 é um grupo alcanodi-ila linear tendo 1 a 4 átomos de carbono.

[0068] Os compostos dessa fórmula e sua preparação são descritos, por exemplo, em US 5.783.565.

[0069] O número inteiro n na fórmula (I) é preferivelmente 0.

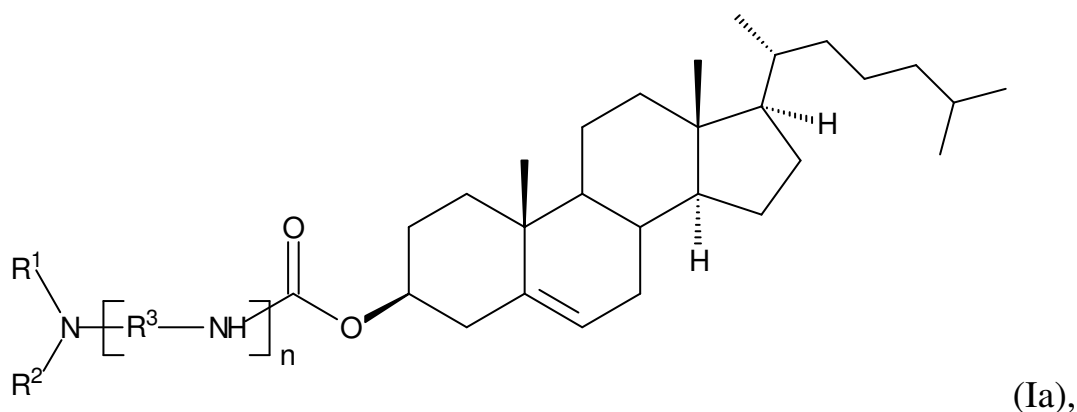
[0070] Os números inteiros q, r, s, t, u e w são de forma preferível independentemente selecionados de 3 e 4.

[0071] Prefere-se também que R^1 seja um grupo $-(CH_2)_q-NH_2$ e R^2 seja um grupo um grupo $-(CH_2)_t-NH_2$ ou um grupo $-(CH_2)_u-NH-(CH_2)_w-NH_2$, ou que R^2 seja um grupo um grupo $-(CH_2)_t-NH_2$, e R^1 seja um grupo $-(CH_2)_q-NH_2$ ou um grupo $-(CH_2)_t-NH-(CH_2)_s-NH_2$. Em ambos os casos, n é também preferivelmente 0.

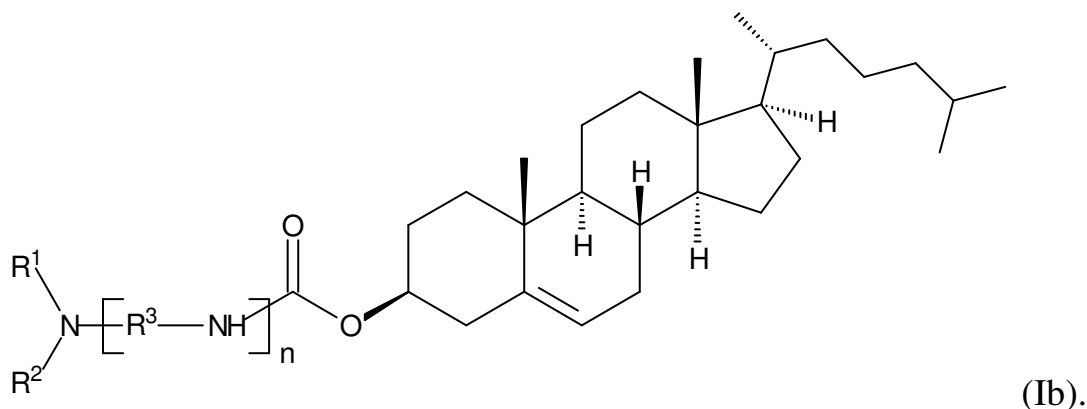
[0072] Formas de sal do derivado de colesterol da fórmula (I) podem ser providas protonando um ou mais dos grupos amino contidos no composto com um ácido de modo que o composto carrega uma carga catiônica. Como será percebido, um grupo amino protonado é um em que um átomo de hidrogênio adicional é ligado ao átomo de nitrogênio do grupo amino, de maneira tal que resulte em um nitrogênio tetravalente que carrega uma carga catiônica. Átomos de nitrogênio adequados no composto da fórmula (I) são o átomo de nitrogênio contido no grupo $-N(R^1)(R^2)$, e os átomos de nitrogênio contidos em R^1 e em R^2 , respectivamente. Deve-se entender que o ânion que idade como um contraíon para qualquer grupo amino protonado é no geral um ânion fisiologicamente aceitável. Nas composições da presente invenção, o composto da fórmula (I) tipicamente formará um sal com os grupos acídicos do RNA. Entretanto, outros contraíons não são excluídos, e exemplos incluem

cloreto, brometo, iodeto, sulfato, nitrato, fosfato, hidrogenofosfato, di-hidrogenofosfato, carbonato, e ânions de hidrogenocarbonato.

[0073] Como será entendido pelos versados na técnica, o composto da fórmula (I) como um derivado de colesterol pode ser ilustrado pela fórmula preferida (Ia):



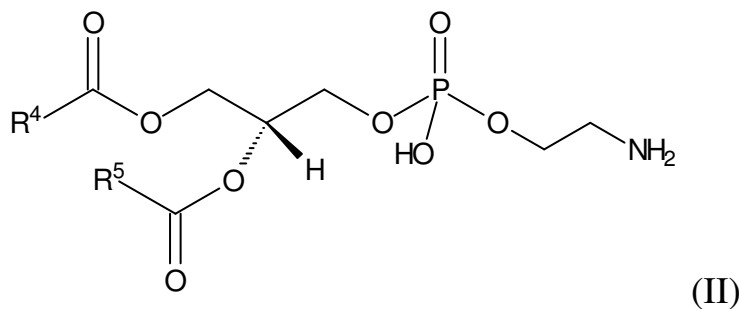
ou a fórmula ainda mais preferida (Ib):



[0074] Nas fórmulas (Ia) e (Ib), as definições e definições preferidas para R^1 , R^2 , R^3 e n dadas anteriormente com relação à fórmula (I) continuam a se aplicar.

[0075] Mais preferivelmente como componente (i-a) da composição de lipídio é GL67 ou um sal do mesmo, em que, com relação à fórmula (I), (Ia) e (Ib), n é 0, R^1 é um grupo $-(CH_2)_3-NH_2$ e R^2 é um grupo $-(CH_2)_4-NH-(CH_2)_3-NH_2$.

[0076] O componente (i-b) da composição de lipídio é um fosfoglicerídeo da fórmula (II) ou um sal do mesmo:



em que

R^4 é um grupo alquila linear tendo 10 a 24 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 24 átomos de carbono;

R^5 é um grupo alquila linear tendo 10 a 24 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 24 átomos de carbono.

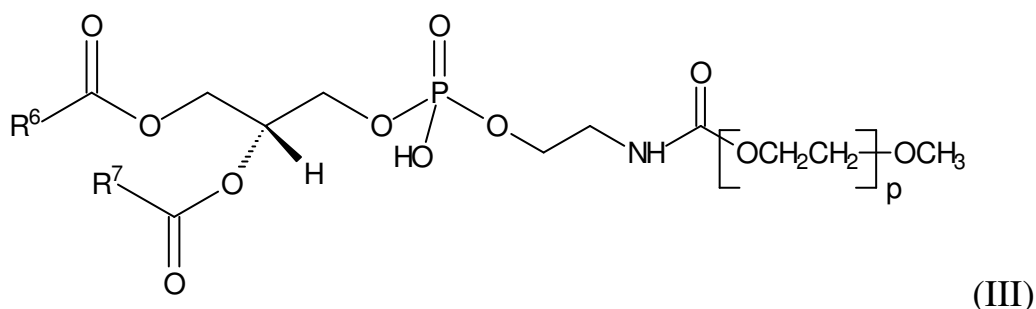
[0077] Preferivelmente, R^4 e R^5 são cada qual um grupo alquila linear tendo 14 a 20 átomos de carbono ou são cada qual um grupo alquenila linear tendo uma ou duas ligações duplas e 14 a 20 átomos de carbono. Mais preferivelmente R^4 e R^5 são cada qual um grupo alquenila linear tendo uma ligação dupla e 14 a 20 átomos de carbono.

[0078] Formas de sal do composto da fórmula (II) incluem formas de sal internas em que o próton do grupo-OH ácido afixado átomo ao P mostrado na fórmula (II) protona o grupo amino mostrado na mesma. Tais formas de sal também incluem sais formados pelo grupo -OH ácido com uma base, ou sais formados pelo grupo amino com um ácido. Novamente, deve-se entender que os sais são no geral sais que são farmacologicamente aceitáveis. Como sais formados com uma base, menção pode ser feita de sais de metal alcalino tais como sais de sódio ou potássio; sais de metal alcalino terroso tais como sais de cálcio ou magnésio e sais de amônio. Como sais formados de exemplo com um ácido, menção pode ser feita de um sal formado com os grupos ácidos do RNA, mas outros sais não são excluídos, e sais de ácido mineral tais como sais de cloreto, brometo, ou sais de iodeto,

sulfato, nitrato, sais de fosfato, sais de hidrogenofosfato, ou sais de di-hidrogenofosfato, sais de carbonato, e sais de hidrogenocarbonato podem ser mencionados como exemplos.

[0079] Mais preferivelmente como o componente (i-b) da composição de lipídio é 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE), ou um sal do mesmo.

[0080] O componente (i-c) da composição de lipídio é um fosfoglicerídeo peguilado da fórmula (III) ou um sal do mesmo:



em que

p é um número inteiro de 5 a 200, preferivelmente 10 a 170 e acima de tudo preferivelmente 10 a 140;

R^6 é um grupo alquila linear tendo 10 a 20 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 20 átomos de carbono;

R^7 é um grupo alquila linear tendo 10 a 20 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 20 átomos de carbono.

[0081] Preferivelmente, R^6 e R^7 são cada qual um grupo alquila linear tendo 10 a 20 átomos de carbono, mais preferivelmente, R^6 e R^7 são cada qual um grupo alquila linear tendo 10 a 16 átomos de carbono.

[0082] Assim, prefere também que, na fórmula (III), R^6 e R^7 sejam cada qual um grupo alquila linear tendo 10 a 16 átomos de carbono e p seja um número inteiro de 10 a 140.

[0083] As formas de sal do composto da fórmula (III) são no geral

sais que são farmacêuticamente aceitáveis. Sais típicos do composto da fórmula (III) são sais formados com uma base, e menção pode ser feita, por exemplo, de sais de metal alcalino tais como sais de sódio ou potássio; sais de metal alcalino terroso tais como sais de cálcio ou magnésio e sais de amônio.

[0084] Fortemente preferido como um componente (i-c) na composição de lipídio é 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DMPE-PEG) ou um sal do mesmo em que a fração de PEG (polietileno glicol) contém 10 a 140 unidades de repetição, isto é, com relação à fórmula (III), R^6 e R^7 são cada qual um grupo alquila linear tendo 13 átomos de carbono, e p é um número inteiro de 10 a 140 nessa modalidade fortemente preferida. Mais preferivelmente como um o componente (i-c) é 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000 (DMPE-PEG5000) ou um sal do mesmo, em que 5000 indica o peso molecular médio numérico da fração de PEG, correspondendo a um valor médio de p de cerca de 113.

[0085] Assim, deve-se perceber que uma composição de lipídio particularmente preferida para uso no contexto da presente invenção é uma em que:

o componente (i-a) é GL67 ou um sal do mesmo,

o componente (i-b) é 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) ou um sal do mesmo, e

o componente (i-c) é 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DMPE-PEG) ou um sal do mesmo, em que a fração de PEG (polietileno glicol) contém 10 a 140 unidades de repetição, e é mais preferivelmente 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000 (DMPE-PEG5000) ou um sal do mesmo.

[0086] Na composição de lipídio contida nas partículas da presente composição, a razão molar dos componentes (i-a), (i-b) e (i-c), isto é, (i-a) : (i-b) : (i-c), é preferivelmente 1 : (0,5 a 5) : (0,01 a 1), mais preferivelmente 1 : (1 a 5) : (0,01 a 0,5) e acima de tudo preferivelmente 1 : (1 a 3) : (0,02 a 0,2).

[0087] A composição de lipídio preferivelmente contém os componentes (i-a), (i-b) e (i-c) como os únicos componentes de lipídio.

[0088] Em linha com o exposto, uma composição fortemente preferida de acordo com o primeiro aspecto da invenção é uma que compreende:

(i) partículas contidas em uma fase líquida, em que as partículas compreendem mRNA e uma composição de lipídio, e em que a composição de lipídio compreende:

(i-a) GL67 ou um sal do mesmo,

(i-b) 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) ou um sal do mesmo, e

(i-c) 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DMPE-PEG) ou um sal do mesmo, em que a fração de PEG (polietileno glicol) contém 10 a 140 unidades de repetição, e é mais preferivelmente 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000 (DMPE-PEG5000) ou um sal do mesmo,

em uma razão molar dos componentes (i-a) : (i-b) : (i-c) de 1 : (1 a 3) : (0,02 a 0,2); e

(ii) 1,2-propanodiol.

[0089] Similarmente, uma modalidade fortemente preferida do terceiro aspecto da invenção se refere a uma composição sólida compreendendo (i) partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio fortemente preferida anterior, e (ii) 1,2-propanodiol, cuja composição sólida é obtenível congelando a composição fortemente preferida anterior.

Partículas

[0090] A composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção e a composição sólida de acordo com o terceiro aspecto da invenção compreendem partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio como discutido anteriormente.

[0091] As partículas tipicamente compreendem nanopartículas compreendendo RNA e a composição de lipídio ou micropartículas compreendendo RNA e a composição de lipídio. Como será entendido pelos versados na técnica, “ou” é usado nesse contexto de uma maneira não exclusiva, a menos que especificamente indicado de outra forma. Assim, a referência a nano ou micropartículas engloba composições contendo nanopartículas, composições contendo micropartículas, e composições contendo tanto nanopartículas quanto 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 μ m ou menos. Preferivelmente, as partículas consistem em nanopartículas compreendendo RNA e a composição de lipídio ou micropartículas compreendendo RNA e a composição de lipídio.

[0092] As partículas contidas nas composições de acordo com a presente invenção preferivelmente mostram um diâmetro de partícula médio na faixa de 1 a 5.000 nm, mais preferivelmente 10 a 4.000 nm, e acima de tudo preferivelmente 50 a 3.000 nm.

[0093] O limite superior para o diâmetro das partículas individuais nas composições de acordo com a invenção é preferivelmente 20 μ m, mais preferivelmente 10 μ m e acima de tudo preferivelmente 5 μ m. Assim, como será entendido pelo exposto, uma formulação de partícula fortemente preferida seria uma com um diâmetro de partícula médio na faixa de 50 a 3.000 nm, e partículas com um diâmetro de partícula máximo de 5 μ m.

[0094] O diâmetro de partículas e o diâmetro de partícula médio da formulação de nano ou micropartícula como referido aqui pode ser convenientemente determinado 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 1,2-propanodiol pode ser usada, como apropriado. No caso de uma composição sólida congelada, o diâmetro de partículas é tipicamente determinado após descongelamento da composição. Em casos onde um tamanho de partícula médio ou um diâmetro de partícula médio é indicado, a média é tipicamente o média z, a menos que indicado de outra forma.

[0095] Nas partículas contidas nas composições de acordo com a invenção, grupos acídicos do RNA tipicamente protonarão grupos amino contidos na formulação de lipídio, de modo que moléculas de RNA aniônicas e moléculas de lipídio catiônicas podem interagir, preferivelmente resultando na formação de complexos entre as moléculas de RNA e as moléculas de lipídio.

[0096] A razão de N/P do número de átomos de nitrogênio N derivado do derivado de colesterol da fórmula (I) na composição de lipídio para o número de grupos fosfato P no RNA é preferivelmente na faixa de 1 a 100, mais preferivelmente 1 a 30, e acima de tudo preferivelmente 2 a 20.

[0097] Preferivelmente, as partículas têm a forma de lipossomos ou de nanopartículas de lipídio.

[0098] Em linha com o exposto, uma composição fortemente preferida de acordo com o primeiro aspecto da invenção é uma que compreende:

(i) nano ou micropartículas contidas em uma fase líquida, em que as nano ou micropartículas compreendem mRNA e uma composição de

lipídio, em que a composição de lipídio compreende:

(i-a) GL67 ou um sal do mesmo,

(i-b) 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) ou um sal do mesmo, e

(i-c) 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DMPE-PEG) ou um sal do mesmo, em que a fração de PEG (polietileno glicol) contém 10 a 140 unidades de repetição, e é mais preferivelmente 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000 (DMPE-PEG5000) ou um sal do mesmo,

em uma razão molar dos componentes (i-a) : (i-b) : (i-c) de 1 : (1 a 3) : (0,02 a 0,2), e em que a razão de N/P do número de átomos de nitrogênio N derivado do derivado de colesterol da fórmula (I) na composição de lipídio para o número de grupos fosfato P no mRNA é 2 a 20; e

(ii) 1,2-propanodiol.

[0099] Similarmente, uma modalidade fortemente preferida do terceiro aspecto da invenção se refere a uma composição sólida compreendendo (i) nano ou micropartículas compreendendo RNA e a composição de lipídio mencionada no parágrafo antecedente, e (ii) 1,2-propanodiol, cuja composição sólida é obtenível congelando a composição fortemente preferida anterior.

[00100] Em adição ao RNA e a composição de lipídio, as partículas nas composições de acordo com a 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 terapêuticamente ativo contido nas mesmas.

[00101] Além do RNA e da composição de lipídio, as partículas

contidas nas composições de acordo com o primeiro e o terceiro aspecto da invenção podem compreender, como um aditivo opcional ou como aditivos opcionais, um ou mais componentes que exercem uma função efetora durante distribuição do agente terapêutico, e preferivelmente durante a distribuição de um ácido ribonucleico como um agente terapêutico em e dentro de uma célula. Tais componentes podem ser, mas não se limitando a poliânions, lipídios adicionais, oligômeros de blindagem ou polímeros, 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).

[00102] Outros polímeros de blindagem de exemplo descritos na literatura que podem ser componentes úteis para uma formulação de partícula compreendendo um complexo de um ácido ribonucleico com um excipiente catiônico incluem hidroxietil amido (HES; Noga *et al.* Journal of Controlled Disease, 2012. 159(1): 92-103, a PAS-/PA-polypeptide (Pro, Ala, Ser (ou Pro,

Ala) polypeptide: Schlapschy et al. *Protein Eng Des Sel.* 2013 Aug;26(8):489-501 or Polysarcosine (Psar.; Heller *et al.* *Macromol Biosci* 2014; 14: 1380-1395).

[00103] Ligantes alvos podem ser úteis, por exemplo, em formulações de partícula para distribuição de ácido 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 de exemplo são a prostaciclina análoga descrita no documento WO 2011/076391, tal como Iloprosta ou Treprostinila. Um anticorpo pode também agir como um ligante alvo. Como ligantes para partículas, 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. Ligantes alvos podem ser acoplados, por exemplo, às extremidades terminais do polímero de blindagem.

[00104] 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).

[00105] Preferivelmente, as partículas têm uma carga ativa, expressa como o peso do RNA como 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 80%(p/p), acima de tudo preferivelmente 1 a 50%(p/p).

Composição compreendendo as partículas e 1,2-propanodiol

[00106] A composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção e a composição sólida de acordo com o terceiro aspecto da invenção compreendem partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio junto com 1,2-propanodiol. Como será percebido, a informação anterior a respeito das modalidades adequadas e preferidas do RNA, da composição de lipídio e das partículas compreendendo-as continua a se aplicar nesse contexto da discussão seguinte.

[00107] Uma vez que a composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção contém RNA como um agente terapeuticamente ativo e é adequada para a administração do agente terapeuticamente ativo a um paciente, ela pode ser referida como composição terapêutica ou composição farmacêutica.

[00108] Na composição de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção que compreende as partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio em uma fase líquida, as partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio são preferivelmente dispersas na fase líquida. Como implícito pelo termo “dispersas”, as partículas formam uma fase descontínua na fase líquida contínua nesse caso. No geral, prefere-se que a dispersão seja provida como uma dispersão bifásica com uma fase líquida contínua e as partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio dispersa como uma fase descontínua na mesma.

[00109] A composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção, em que as partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio estão contidas em uma fase líquida, preferivelmente compreende as partículas em uma quantidade de maneira a prover o RNA contido nas partículas a uma concentração de 0,01 a 50 mg/ml, mais preferivelmente 0,02 a 30 mg/ml, e acima de tudo preferivelmente 0,05 a 10 mg/ml, com base no volume total da composição.

[00110] Tipicamente, o 1,2-propanodiol é contido como um componente adicional na fase líquida da composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção, em que as partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio estão contidas, preferivelmente suspensas. O 1,2-propanodiol é preferivelmente dissolvido na fase líquida. Entretanto, ele pode também ser parcialmente associado com as partículas contidas na fase líquida.

[00111] Na composição de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção compreendendo as partículas contidas em uma fase líquida, o 1,2-propanodiol é preferivelmente presente a uma concentração de 0,1 a 50% em p/v, mais preferivelmente 0,2 a 30% em p/v, acima de tudo preferivelmente 0,3 a 20% em p/v, onde o valor de porcentagem indica o peso do 1,2-propanodiol em g por 100 ml do volume total da composição.

[00112] A fase líquida em que as partículas são contidas, preferivelmente dispersas, 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 providos por água. Mais preferivelmente, água e o 1,2-propanodiol são os únicos solventes contidos na fase líquida.

[00113] Como aditivos opcionais adicionais de exemplo da fase líquida, um ou mais selecionados de sais, açúcar, solventes orgânicos e tampões podem ser mencionados. Tampões podem ser usados que são convencionalmente usados em aplicações farmacêuticas ou biológicas.

[00114] A composição sólida de acordo com o terceiro aspecto da invenção contém os mesmos componentes da composição que pode ser congelada para obter a composição sólida. Assim, a informação a respeito das modalidades adequadas e preferidas do RNA, da composição de lipídio, das partículas compreendendo RNA e da composição de lipídio, do 1,2-propanodiol, e da fase líquida e seus componentes providos anteriormente se aplica igualmente para a composição compreendendo a fase líquida e para a composição sólida. Entretanto, como será percebido pelos versados na técnica, a fase líquida foi solidificada na composição sólida. Até esse ponto, a composição sólida preferivelmente contém uma dispersão da formulação de partícula do agente terapêutico em uma fase sólida contínua de um líquido congelado. Em linha com o exposto, o 1,2-propanodiol é preferivelmente contido na fase contínua em que a formulação de partícula é dispersa.

[00115] Em linha com o exposto, uma composição fortemente preferida de acordo com o primeiro aspecto da invenção é uma que compreende:

(i) nano ou micropartículas dispersas em uma fase líquida compreendendo água como um solvente, em que as nano ou micropartículas compreendem mRNA e uma composição de lipídio, em que a composição de lipídio compreende:

(i-a) GL67 ou um sal do mesmo,

(i-b) 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE) ou um sal do mesmo, e

(i-c) 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DMPE-PEG) ou um sal do mesmo, em que a fração de PEG (polietileno glicol) contém 10 a 140 unidades de repetição, e é mais preferivelmente 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000 (DMPE-PEG5000) ou um sal do mesmo,

em uma razão molar dos componentes (i-a) : (i-b) : (i-c) de 1 :

(1 a 3) : (0,02 a 0,2),

e em que a razão de N/P do número de átomos de nitrogênio N derivado do derivado de colesterol da fórmula (I) na composição de lipídio para o número de grupos fosfato P no mRNA é 2 a 20; e

(ii) 1,2-propanodiol como um componente adicional na fase líquida em que as nano ou micropartículas são suspensas;

e em que a composição contém o 1,2-propanodiol em uma quantidade de 0,3 a 20% em p/v do 1,2-propanodiol, com base no volume total da composição.

[00116] Similarmente, uma modalidade fortemente preferida do terceiro aspecto da invenção se refere a uma composição sólida compreendendo (i) nano ou micropartículas compreendendo RNA e a composição de lipídio mencionada no parágrafo antecedente, e (ii) 1,2-propanodiol, cuja composição sólida é obtível congelando a composição fortemente preferida anterior.

Aplicações Farmacêuticas

[00117] Como já mencionado anteriormente, as moléculas de RNA, preferivelmente as moléculas de mRNA, que estão presentes nas composições de acordo com a presente invenção como definido anteriormente são particularmente úteis em um ambiente médico e no tratamento de certas doenças e, em particular, em terapias baseadas em RNA. Assim, as composições de acordo com a invenção compreendendo as moléculas de RNA são adequadas como composições farmacêuticas.

[00118] Em particular, a composição de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção é adequada para administração a um sujeito. Assim, o RNA, preferivelmente o mRNA, contido na mesma pode também ser distribuído ao sujeito. Uma via preferida de administração para a composição é a administração ao ou por meio do trato respiratório, em particular administração pulmonar ou administração nasal.

[00119] Entretanto, será percebido pelos versados na técnica que a composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode também ser administrada por meio de outras vias de administração que são conhecidas na técnica para formulações de partícula de um agente terapeuticamente ativo, tal como a administração intravenosa na forma de uma dispersão.

[00120] Dispositivos para formar um aerossol de uma composição compreendendo partículas contidas 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 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.

[00121] Assim, um aspecto adicional da presente invenção se refere a um dispositivo para formar um aerossol de uma composição de particulado contida em um líquido ou para nebulizar uma composição como essa, cujo dispositivo compreende a composição de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção. O dispositivo é preferivelmente um inalador selecionado de um inalador de dose medida, um nebulizador, e um dispositivo de pulverização nasal.

[00122] Por meio de uma administração como essa a um sujeito, o RNA contido nas partículas pode ser distribuído às células alvos ao ou por meio do trato respiratório. A expressão “distribuído às células alvos” preferivelmente significa transferência do RNA, preferivelmente RNA de fita única tal como mRNA, para a célula.

[00123] 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, o 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. 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.

[00124] Também disponibilizado pela presente invenção é um método de tratamento, compreendendo administrar a composição de acordo com o primeiro aspecto da 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. Assim, o RNA contido na dita composição pode causar um efeito preventivo ou terapêutico. Notavelmente, o termo “paciente” compreende animais e humanos.

[00125] Pela administração da composição da presente invenção, em particular, o primeiro aspecto da invenção, a um sujeito, 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 genéticas. 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, nos equipamentos genéticos de um organismo, nos fatores comportamentais, sociais ou ambientais tal como a exposição a produto químico ou radiação.

[00126] Os termos “tratamento” ou “tratando” usada aqui no geral significa obtenção de um efeito farmacológico e/ou fisiológico desejado. Dessa maneira, o tratamento da presente invenção pode se referir ao tratamento de estados (agudos) de uma certa doença, mas pode também se referir ao tratamento profilático em termos de prevenir completa ou parcialmente uma doença ou sintoma da mesma. Preferivelmente, o termo “tratamento” é deve ser entendido sendo terapêutico em termos de curar parcial ou completamente uma doença e/ou efeitos adversos e/ou sintomas atribuídos à doença. “Agudo” a esse respeito significa que o sujeito mostra sintomas da doença. Em outras palavras, o sujeito a ser tratado tem uma necessidade real de um tratamento e a expressão “tratamento agudo” no contexto da presente invenção se refere às medidas tomadas para realmente tratar a doença após o início de ação da doença ou o surto da doença. O tratamento pode também ser tratamento profilático ou preventivo, isto é, medidas tomadas para prevenção da doença, por exemplo, a fim de prevenir a infecção e/ou o início de ação da doença. O progresso terapêutico pode ser monitorado por avaliação periódica.

[00127] No geral, o RNA, preferivelmente o mRNA, é incluído em uma quantidade eficaz na composição de acordo com a presente invenção. A expressão “quantidade eficaz” se refere a uma quantidade suficiente para induzir uma resposta terapêutica detectável no sujeito ao qual a composição farmacêutica deve ser administrada. De acordo com o exposto, o teor do

RNA, preferivelmente do mRNA, de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção anterior na composição farmacêutica não é limitado desde que ele seja útil para tratamento como descrito anteriormente. Como notado anteriormente, a composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção, em que as partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio estão contidas em uma fase líquida, preferivelmente compreende as partículas em uma quantidade de maneira a prover o RNA contido nas partículas a uma concentração de 0,01 a 50 mg/ml, mais preferivelmente 0,02 a 30 mg/ml, e acima de tudo preferivelmente 0,05 a 10 mg/ml, com base no volume total da composição.

[00128] De acordo com essa invenção, a expressão “composição farmacêutica” se refere a uma composição de acordo com a invenção, em particular uma composição de acordo com o primeiro aspecto da presente invenção, para administração a um sujeito. Sujeitos de exemplo incluem um mamífero tal como um cão, gato, porco, vaca, cabra, cavalo, roedor, por exemplo, rato, camundongo, e porquinho-da-índia, ou um primata, por exemplo, gorila, chimpanzé e humano. Em uma modalidade acima de tudo preferível, o sujeito é um humano.

[00129] A composição farmacêutica da presente invenção pode ser para uso em terapias baseadas em RNA. Como mencionado anteriormente, 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 farmacêuticamente ativo tendo um efeito terapêutico ou preventivo. Assim, em modalidades preferidas, a composição farmacêutica da presente invenção pode ser para uso em terapias baseadas em RNA no tratamento ou prevenção de uma doença como citado na **Tabela 2** anterior. 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 2** anterior.

[00130] Assim, a composição farmacêutica da presente invenção pode ser para uso em terapias baseadas em RNA em casos onde os defeitos do gene descritos na **Tabela 2** anterior 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.

[00131] Em outras modalidades, a composição farmacêutica 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 farmacêuticamente 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 2**.

[00132] A composição farmacêutica da presente invenção é particularmente adequada para uso em terapias baseadas em RNA no tratamento ou prevenção de doenças pulmonares. Como doenças de exemplo, Alfa-1-antitripsina, Asma, Fibrose cística, Disfunção de metabolismo de tensoativo ou discinesia ciliar Primária como citado na **Tabela 2** anterior podem ser mencionados.

[00133] Em outras modalidades de exemplo, a composição farmacêutica 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 subjacente, 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).

[00134] 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, papiloma vírus 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.

Processos para Preparação

[00135] Técnicas adequadas para a provisão de partículas compreendendo um ácido nucleico e uma composição de lipídio em uma fase líquida são disponíveis aos versados na técnica, e podem ser adaptadas a fim de prover as composições de acordo com o primeiro aspecto da invenção em que as partículas compreendem RNA junto com a composição de lipídio discutida anteriormente.

[00136] Por exemplo, lipossomos como partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio podem ser convenientemente providos por meio de reidratação da composição de lipídio, tal como a reidratação de películas de lipídio, seguido por técnicas de homogeneização como, por exemplo, ultrassonicação ou extrusão, onde exigido. Uma abordagem alternativa é a infusão de uma composição de lipídio dissolvida em um solvente orgânico em água ou uma solução aquosa. Como um método exemplar, no qual se pode basear, por exemplo, para a formação de nanopartículas de lipídio, o método de deslocamento de solvente pode ser mencionado.

[00137] Como um método alternativo para a provisão de composições de acordo com a invenção em que partículas são contidas em uma fase líquida, métodos de precipitação, tal como nanoprecipitação das partículas, pode ser mencionado.

[00138] O 1,2-propanodiol pode ser convenientemente adicionado a uma fase líquida em que partículas compreendendo RNA e uma composição de lipídio estão contidas, ou em que as partículas devem ser providas. A adição do 1,2-propanodiol à fase líquida pode ser realizada em um ou mais de vários estágios incluindo antes, durante ou após provimento das partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio na fase líquida.

[00139] Assim, como notado anteriormente, um aspecto adicional da invenção se refere a um processo para a preparação de uma composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção, o dito processo compreendendo as etapas de:

a) dissolver e misturar os componentes da composição de lipídio em um solvente orgânico, seguido pela liofilização da composição de lipídio;

b) reidratar a composição de lipídio liofilizada por meio de adição de água;

c) combinar a composição de lipídio reidratada com uma solução aquosa do RNA para permitir que partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio sejam formadas que estão contidas em uma fase líquida; e

d) adicionar 1,2-propanodiol.

[00140] A adição do 1,2-propanodiol pode ser convenientemente realizada, por exemplo, adicionando-o junto com água na etapa b), adicionando-o à composição de lipídio reidratada após a etapa b), adicionando-o junto com a solução aquosa do RNA na etapa c), ou adicionando-o à fase líquida após a etapa c), em que as partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio estão contidas. Deve-se perceber que a adição pode ser realizada em uma etapa ou em múltiplas etapas, por exemplo, em diferentes estágios do processo.

[00141] A composição sólida de acordo com o terceiro 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:

a) dissolver e misturar os componentes da composição de lipídio em um solvente orgânico, seguido pela liofilização da composição de lipídio;

b) reidratar a composição de lipídio liofilizada por meio de adição de água;

c) combinar a composição de lipídio reidratada com uma solução aquosa do RNA para permitir que partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio sejam formadas que estão contidas em uma fase líquida; e

d) adicionar 1,2-propanodiol;

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

[00142] Também nesse processo, a adição do 1,2-propanodiol pode ser convenientemente realizada, por exemplo, adicionando-o junto com água na etapa b), adicionando-o à composição de lipídio reidratada após a etapa b), adicionando-o junto com a solução aquosa do RNA na etapa c), ou adicionando-o à fase líquida após a etapa c), em que as partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio estão contidas. Deve-se perceber que a adição pode ser realizada em uma etapa ou em múltiplas etapas, por exemplo, em diferentes estágios do processo.

[00143] A etapa de congelamento como uma segunda etapa é tipicamente realizada submetendo a composição de suspensão a temperaturas suficientemente frias (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.

[00144] Incidentalmente, como explicado anteriormente, a composição sólida de acordo com o terceiro aspecto da invenção é uma composição que permite que partículas compreendendo RNA sejam armazenadas. Neste ponto, deve-se entender que uma composição de acordo com o primeiro aspecto da invenção pode também ser recuperada da composição sólida de acordo com o terceiro aspecto da invenção por descongelamento da composição sólida.

[00145] 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:

a) dissolver e misturar os componentes da composição de lipídio em um solvente orgânico, seguido pela liofilização da composição de lipídio;

b) reidratar a composição de lipídio liofilizada por meio de adição de água;

c) combinar a composição de lipídio reidratada com uma solução aquosa do RNA para permitir que partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio sejam formadas que estão contidas em uma fase líquida; e

d) adicionar 1,2-propanodiol;

uma segunda etapa de congelar a composição obtida na primeira etapa,

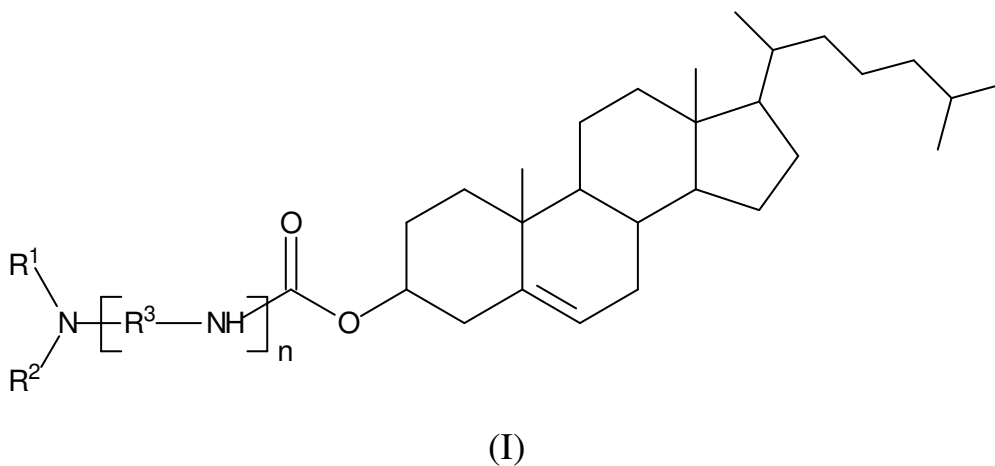
e uma terceira etapa de descongelar a composição congelada obtida na segunda etapa.

[00146] 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.

[00147] 1. Uma composição compreendendo:

(i) partículas contidas em uma fase líquida, em que as partículas compreendem RNA e uma composição de lipídio, e em que a composição de lipídio compreende:

(i-a) um derivado de colesterol da fórmula (I) ou um sal do mesmo:



em que

n é 0 ou 1, preferivelmente 0,

R^1 é um grupo $-(CH_2)_q-NH_2$ ou um grupo $-(CH_2)_r-NH-(CH_2)_s-NH_2$,

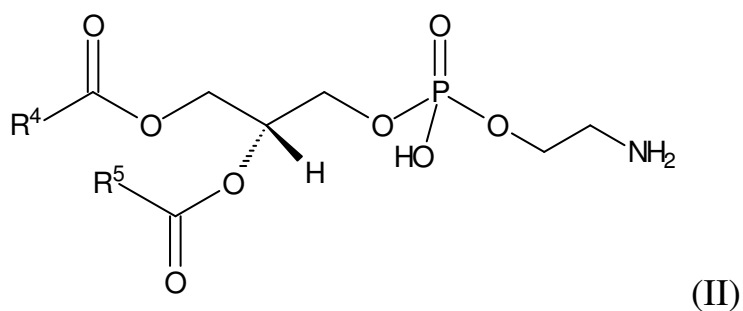
em que q , r e s são independentemente um número inteiro de 2 a 6,

R^2 é um grupo $-(CH_2)_t-NH_2$ ou um grupo $-(CH_2)_u-NH-(CH_2)_w-NH_2$,

em que t , u e w são independentemente um número inteiro de 2 a 6,

R^3 é um grupo alcanodi-ila linear tendo 1 a 4 átomos de carbono;

(i-b) um fosfoglicerídeo da fórmula (II) ou um sal do mesmo:



em que

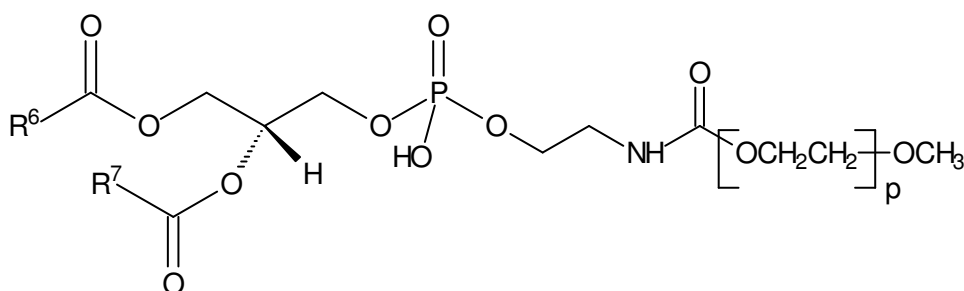
R^4 é um grupo alquila linear tendo 10 a 24 átomos de carbono

ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 24 átomos de carbono;

R^5 é um grupo alquila linear tendo 10 a 24 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 24 átomos de carbono;

e

(i-c) um fosfoglicerídeo peguilado da fórmula (III) ou um sal do mesmo:



(III)

em que

p é um número inteiro de 5 a 200, preferivelmente 10 a 170 e acima de tudo preferivelmente 10 a 140

R^6 é um grupo alquila linear tendo 10 a 20 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 20 átomos de carbono;

R^7 é um grupo alquila linear tendo 10 a 20 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 20 átomos de carbono;

e

(ii) 1,2-propanodiol.

[00148] 2. A composição de acordo com o item 1, em que o RNA é mRNA.

[00149] 3. A composição de acordo com o item 1 ou 2, em que, na fórmula (I), n é 0, R^1 é um grupo $-(CH_2)_3-NH_2$ e R^2 é um grupo

-(CH₂)₄-NH-(CH₂)₃-NH₂.

[00150] 4. A composição de acordo com o item 1 ou 2, em que o derivado de colesterol da fórmula (I) é GL67.

[00151] 5. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 4, em que, na fórmula (II), R⁴ e R⁵ são cada qual um grupo alquenila linear tendo uma ligação dupla e 14 a 20 átomos de carbono.

[00152] 6. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 4, em que o fosfoglicerídeo da fórmula (II) é 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina (DOPE).

[00153] 7. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 6, em que, na fórmula (III), R⁶ e R⁷ são cada qual um grupo alquila linear tendo 10 a 16 átomos de carbono e p é um número inteiro de 10 a 140.

[00154] 8. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 6, em que o fosfoglicerídeo peguilado da fórmula (III) é 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG (DMPE-PEG) em que a fração de PEG contém 10 a 140 unidades de repetição, e é mais preferivelmente 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000 (DMPE-PEG5000).

[00155] 9. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 8, em que a razão molar dos componentes (i-a) : (i-b) : (i-c) na composição de lipídio é:

1 : (0,5 a 5) : (0,01 a 1),

mais preferivelmente

1 : (1 a 5) : (0,01 a 0,5),

acima de tudo preferivelmente

1: (1 a 3) : (0,02 a 0,2).

[00156] 10. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 9, em que as partículas são nano ou micropartículas.

[00157] 11. A composição de acordo com o item 10, em que as partículas têm diâmetro de partícula médio na faixa de 1 a 5.000 nm, mais

preferivelmente 10 a 4.000 nm, e acima de tudo preferivelmente 50 a 3.000 nm.

[00158] 12. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 11, em que as partículas têm um diâmetro de partícula máximo de 20 μm , mais preferivelmente 10 μm , e acima de tudo preferivelmente 5 μm .

[00159] 13. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 12, em que a razão de N/P do número de átomos de nitrogênio N derivado do derivado de colesterol da fórmula (I) par o número de grupos fosfato P no RNA é na faixa de 1 a 100, mais preferivelmente 1 a 30, e acima de tudo preferivelmente 2 a 20.

[00160] 14. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 13, em que as partículas têm uma carga ativa, expressa como o peso do RNA para o peso total das partículas, na faixa de 0,1 a 95%, mais preferivelmente 0,5 a 80%, acima de tudo preferivelmente 1 a 50%.

[00161] 15. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 14, que compreende as partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio em uma quantidade de maneira a prover RNA a uma concentração de 0,01 a 50 mg/ml, mais preferivelmente 0,02 a 30 mg/ml e acima de tudo preferivelmente 0,05 a 10 mg/ml, com base no volume total da composição.

[00162] 16. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 15, em que as partículas compreendendo RNA e uma composição de lipídio são dispersas na fase líquida.

[00163] 17. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 16, em que o 1,2-propanodiol é contido na fase líquida na qual as partículas são contidas.

[00164] 18. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 17, em que o 1,2-propanodiol é contido a uma concentração de 0,1 a 50% em p/v, mais preferivelmente 0,2 a 30% em p/v, e acima de tudo preferivelmente 0,3 a 20% em p/v, com base no volume total da composição.

[00165] 19. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 18, em que a fase líquida na qual as partículas são contidas compreende água.

[00166] 20. A composição de acordo com o item 19, em que 50% em volume ou mais, mais preferivelmente 70% em volume ou mais, com base no volume total da fase líquida, são providos por água.

[00167] 21. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 20, em que água e o 1,2-propanodiol são os únicos solventes contidos na fase líquida.

[00168] 22. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 21, em que a fase líquida em que as partículas são contidas compreende um tampão.

[00169] 23. Um processo para a preparação de uma composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 22, o dito processo compreendendo as etapas de:

a) dissolver e misturar os componentes da composição de lipídio em um solvente orgânico, seguido pela liofilização da composição de lipídio;

b) reidratar a composição de lipídio liofilizada por meio de adição de água;

c) combinar a composição de lipídio reidratada com uma solução aquosa do RNA para permitir que partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio sejam formadas que estão contidas em uma fase líquida; e

d) adicionar 1,2-propanodiol.

[00170] 24. Uma composição sólida compreendendo:

i) partículas compreendendo RNA e uma composição de lipídio, e

ii) 1,2-propanodiol,

cujas composição sólida é obtível congelando a composição

de acordo com qualquer um dos itens 1 a 22.

[00171] 25. A composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 22 para uso no tratamento de prevenção de uma doença por meio de uma terapia baseada em RNA.

[00172] 26. A composição para uso de acordo com o item 25 em que a doença a ser tratada ou prevenida é uma doença pulmonar.

[00173] 27. A composição para uso de acordo com o item 25 ou 26, em que o tratamento ou prevenção envolve a administração da composição ao ou por meio do trato respiratório, preferivelmente por meio de administração pulmonar ou administração nasal.

[00174] 28. 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.

[00175] 29. O método de acordo com o item 28 para o tratamento de uma doença pulmonar.

[00176] 30. Um dispositivo para formar um aerossol de uma composição de particulado contida em um líquido ou para nebulizar uma composição como essa, cujo dispositivo compreende a composição de acordo com qualquer um dos itens 1 a 22.

[00177] 31. O dispositivo de acordo com o item 30, em que o dispositivo é um inalador selecionado de um inalador de dose medida, um nebulizador, e um dispositivo de pulverização nasal.

Exemplos

Abreviações

<u>Abreviação</u>	<u>Descrição</u>
RT	Temperatura ambiente
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
FLuc	Luciferase de vagalume
w/o	sem
cmRNA	Ácido ribonucleico quimicamente modificado
FLuc	Luciferase de vagalume

PG
N/P1,2-propanodiol, propileno glicol
Número de átomos de nitrogênio em derivado de
colesterol (I) para número de grupos fosfato em
mRNA**Exemplo I: Aplicação de complexos em culturas de ALI***Métodos:*

[00178] Formulação de complexo RNA-Lipídio a N/P5 (e N/P3):

[00179] Soluções estoques de GL67, DOPE e DMPE-PEG5000 foram produzidas a uma concentração de 10 a 20 mg/mL cada qual em mistura de 9:1 de t-butanol e água. Lipídios foram misturados em uma razão molar de 1:2:0,05 (GL67:DOPE:DMPE-PEG5000) a uma massa de lipídio total de 5mg, congelada a -80°C por toda a noite e liofilizada por pelo menos 96h. Antes do uso a mistura de lipídio seco foi reidratada por adição de 400µL 5% (v/v) de propileno glicol (resultando em uma concentração de lipídio total de 12,5mg/mL) seguido por incubação à temperatura ambiente por 30min sem agitação, vortexando por 10s seguido por ultrassonicação em um banho de água a 37°C por 10min. A mistura de lipossomo gerada foi diluída para complexação com mRNA. Para esse propósito 69,65µL (87,69µL para N/P3) de água foram misturados com 10,24µL de propileno glicol e vortexados por 3s. 45,10µL (27,06µL para N/P3) de mistura de lipossomo foram adicionados e a mistura foi vortexada por 10 s e equilibrada a 39°C por 3min. 125µL de solução de mRNA em água (c: 0,5mg/mL) foram equilibrados a 39°C por 3 min. Para montagem de complexo, a diluição de mRNA foi encharcada na seringa de agulha fina (seringa BD Micro-Fine Insuline 0,5 mL U40 8 mm, 07468060 Becton Dickinson), injetada rapidamente na diluição de lipossomo, imediatamente vortexada por 10s e incubada por 10min à RT para montagem de complexo. Os complexos foram então armazenados em gelo.

Tratamento de culturas de ALI

[00180] MucilAir™-ALI foram obtidos da Epithelix (França). 5 dias antes da transfecção foi realizada uma lavagem no muco, para remover o muco acumulado na superfície apical. 200µL de PBS^{-/-} foram adicionados no

lado apical e incubados por 20min a 37°C. Para separar o muco da superfície apical 3 foram feitos movimentos para frente e para trás com 100µL do líquido apical com uma pipeta. PBS^{-/-} da superfície apical de MucilAir™ foi removido por aspiração suave sem danificar o epitélio. No dia de transfecção as culturas de ALI foram novamente lavadas com 200µL de PBS^{-/-} seguido por uma etapa de lavagem com 200µL do diluente correspondente do complexo de mRNA (água ou propileno glicol 5%). O diluente foi removido imediatamente da superfície apical das culturas de ALI por aspiração suave sem danificar o epitélio. Então, cada poço foi transfectado com 3µg de mRNA complexado total em um volume de 50µL. As formulações foram diluídas com o diluente correspondente, adicionadas à superfície apical da cultura de ALI e incubadas por 6h a 37°C e 5% CO₂. Posteriormente a solução do complexo foi removida e a camada de célula lavada com PBS^{-/-} e mantida como cultura de ALI por 24h a 37°C e 5% CO₂.

Detecção de tdTomato por meio de microscopia de fluorescência:

[00181] Formação de imagem por fluorescência foi usado para detectar sinal de tdTomato positivo 24h após transfecção. De cada poço uma imagem representativa com as seguintes definições foi feita: Exposição: 500ms, Ganho: 1,5, Intensidade: 30%.

Resultados:

[00182] Para o tratamento de culturas de ALI um mRNA que codifica para tdTomato foi usado. Poços tratados foram analisados quanto a proteína de tdTomato 24h após o tratamento. Na Figura 1, imagens de exemplo são mostradas.

[00183] Como mostrado na Figura 1, a adição de propileno glicol aumenta significativamente o nível de mRNA que é distribuído às células e traduzido em proteína. Esse efeito pode ser observado em N/P 3 bem como N/P 5.

Exemplo II: Aplicação nasal de complexos

Métodos:

[00184] Formulação de complexo RNA-Lipídio:

Complexos foram formados como previamente descrito no Exemplo I

Tratamento de animais:

[00185] Camundongos Balb/c (Charles River Laboratories) foram tratados com complexos a uma dose de mRNA de 10µg/40µL. A solução foi aplicada como uma gotícula nas narinas do animal durante anestesia por inalação de Isoflurano (Isothesia, Henry Shina, Alemanha).

Deteção de nível de luciferase no tecido do nariz:

[00186] 5h após aplicação D-Luciferina 1,5mg dissolvido em 50µL de PBS foi aplicada intranasalmente (método de aspiração) nas narinas de cada animal. Formação de imagem por bioluminescência foi conduzida usando um sistema de formação de imagem *in vivo* IVIS 100 (Perkin Elmer, USA). Imediatamente após a formação de imagem, os animais foram sacrificados por desarticulação cervical. As imagens foram analisadas usando software Living Image (Perkin Elmer, USA) por meio de medição da radiância em uma região de interesse (ROI) definida. Os valores são mostrados como radiância média [p/s/cm²/sr].

Resultados:

[00187] Para o tratamento de camundongos Balb/c por meio de aspiração pelo nariz mRNA que codifica para luciferase de vagalume complexado a N/P 5 foi usado. Resultados da análise do tecido do nariz para atividade de luciferase 5h após o tratamento (Figura 2A Figura 2) mostram que complexos em uma solução de propileno glicol 5% resulta em maior atividade de proteína repórter no tecido do nariz comparado aos mesmos complexos na ausência de propileno glicol (0% em pG, água).

Exemplo III: Estabilização de tamanho de partícula durante um ciclo congelamento-descongelamento

Métodos:

[00188] Formulação de partículas:

Partículas foram formadas como descrito no Exemplo I.

[00189] Congelamento de solução de partícula:

Após a formulação, as partículas foram congeladas armazenando-as por pelo menos 16h a -20°C.

Medição de tamanho:

[00190] O diâmetro hidrodinâmico das partículas foi medido por espalhamento dinâmico de luz usando um ZetaSizer Nano ZS (Malvern instruments). Para uma medição correta, a composição tampão usada pelo software para calcular a viscosidade das soluções foi ajustada a uma solução contendo 1,2-propanodiol, se aplicável.

Resultados:

[00191] Partículas foram formuladas. Após a formulação, o tamanho de partícula das partículas frescas foi medido em uma solução com ou sem 1,2-propanodiol. As partículas foram congeladas por 16h a -20°C e descongeladas por incubação à RT. O tamanho de partícula nas soluções descongeladas foi medido novamente. Para manter a atividade, o desvio do tamanho de partícula antes de congelamento e após descongelamento deveria ser mínimo. Como mostrado na Figura 3, partículas que foram congeladas em uma solução sem 1,2-propanodiol aumentam significativamente de tamanho devido aos processos de agregação durante o congelamento. Na presença de 1,2-propanodiol, o tamanho de partícula permanece estável após o ciclo congelamento-descongelamento.

Figuras:

[00192] A Figura 1 mostra o nível de tdTomato após transfecção com complexos GL67 em diferentes soluções de excipiente (água (propileno glicol 0%) ou propileno glicol 5%) a N/P 3 e 5.

[00193] A Figura 2 mostra a atividade de luciferase no nariz de

camundongos Balb/c 5h após o tratamento com complexos GL67 em água ou em uma solução propileno glicol 5%.

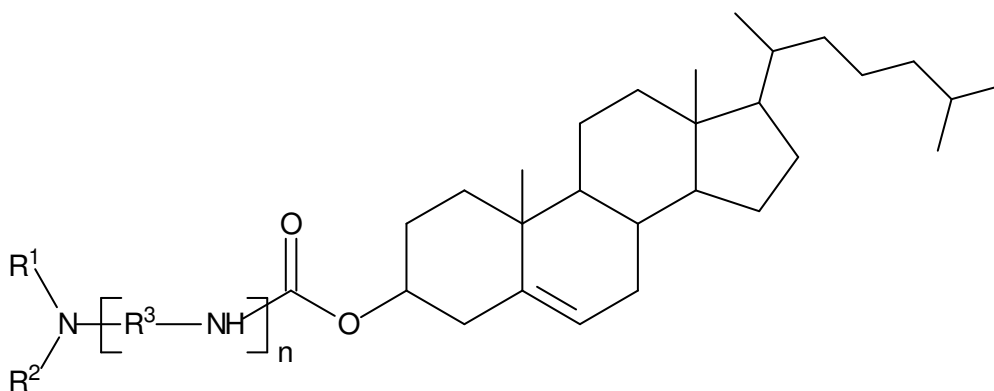
[00194] A Figura 3 mostra o tamanho de partícula antes de congelamento e após descongelamento na presença ou ausência de 1,2-propanodiol.

REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende:

(i) partículas contidas em uma fase líquida, em que as partículas compreendem RNA e uma composição de lipídio, e em que a composição de lipídio compreende:

(i-a) um derivado de colesterol da fórmula (I) ou um sal do mesmo:



(I)

em que

n é 0 ou 1, preferivelmente 0,

R^1 é um grupo $-(CH_2)_q-NH_2$ ou um grupo $-(CH_2)_r-NH-(CH_2)_s-NH_2$,

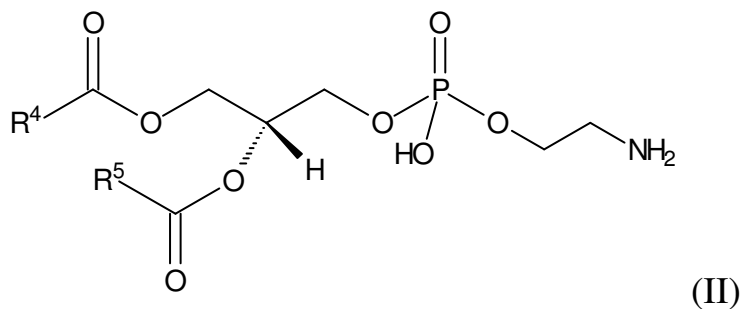
em que q , r e s são independentemente um número inteiro de 2 a 6,

R^2 é um grupo $-(CH_2)_t-NH_2$ ou um grupo $-(CH_2)_u-NH-(CH_2)_w-NH_2$,

em que t , u e w são independentemente um número inteiro de 2 a 6,

R^3 é um grupo alcanodi-ila linear tendo 1 a 4 átomos de carbono;

(i-b) um fosfoglicerídeo da fórmula (II) ou um sal do mesmo:



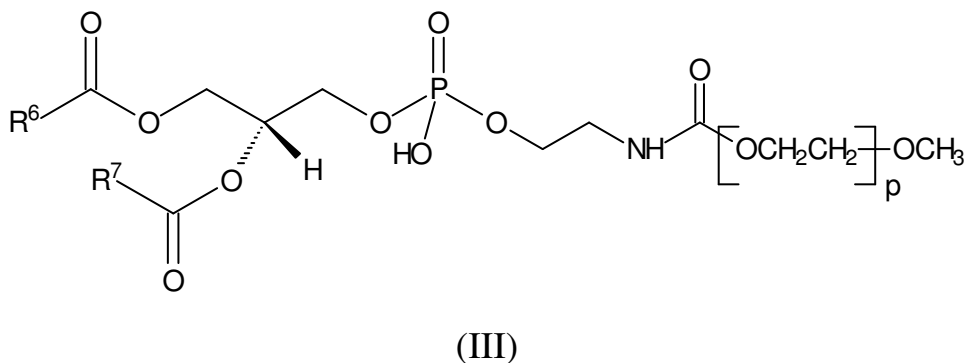
em que

R^4 é um grupo alquila linear tendo 10 a 24 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 24 átomos de carbono;

R^5 é um grupo alquila linear tendo 10 a 24 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 24 átomos de carbono;

e

(i-c) um fosfoglicerídeo peguilado da fórmula (III) ou um sal do mesmo:



em que

p é um número inteiro de 5 a 200, preferivelmente 10 a 170 e acima de tudo preferivelmente 10 a 140

R^6 é um grupo alquila linear tendo 10 a 20 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 20 átomos de carbono;

R^7 é um grupo alquila linear tendo 10 a 20 átomos de carbono ou um grupo alquenila linear tendo 1 a 3 ligações duplas e 10 a 20 átomos de

carbono;

e

(ii) 1,2-propanodiol.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que o RNA é mRNA.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que o derivado de colesterol da fórmula (I) é GL67.

4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 3, caracterizada pelo fato de que o fosfoglicerídeo da fórmula (II) é 1,2-dioleoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina.

5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 4, caracterizada pelo fato de que o fosfoglicerídeo peguilado da fórmula (III) é 1,2-dimiristoil-sn-glicero-3-fosfoetanolamina-PEG5000.

6. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 5, caracterizada pelo fato de que a razão molar dos componentes (i-a) : (i-b) : (i-c) na composição de lipídio é 1 : (0,5 a 5) : (0,01 a 1).

7. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 6, caracterizada pelo fato de que as partículas têm diâmetro de partícula médio na faixa de 1 a 5.000 nm.

8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 7, caracterizada pelo fato de que a razão de N/P do número de átomos de nitrogênio N derivado do derivado de colesterol da fórmula (I) para o o número de grupos fosfato P no RNA é na faixa de 1 a 100.

9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 8, caracterizada pelo fato de que o 1,2-propanodiol é contido a uma concentração de 0,1 a 50% em p/v, com base no volume total da composição.

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 9, caracterizada pelo fato de que a fase líquida na qual as partículas são contidas compreende água.

11. Processo para a preparação de uma composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizado pelo fato de que o dito processo compreende as etapas de:

a) dissolver e misturar os componentes da composição de lipídio em um solvente orgânico, seguido pela liofilização da composição de lipídio;

b) reidratar a composição de lipídio liofilizada por meio de adição de água;

c) combinar a composição de lipídio reidratada com uma solução aquosa do RNA para permitir que partículas compreendendo RNA e a composição de lipídio sejam formadas que estão contidas em uma fase líquida; e

d) adicionar 1,2-propanodiol.

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

(i) partículas compreendendo RNA e uma composição de lipídio, e

(ii) 1,2-propanodiol,

cujas composição sólida é obtível congelando a composição como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 10.

13. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 1 a 10, caracterizada pelo fato de que é para uso no tratamento de prevenção de uma doença por meio de uma terapia baseada em RNA.

14. Composição para uso como definido na reivindicação 13, caracterizada pelo fato de que a doença a ser tratada ou prevenida é uma doença pulmonar.

15. Composição para uso de acordo com a reivindicação 13 ou 14, caracterizada pelo fato de que o tratamento ou prevenção envolve a administração da composição ao ou por meio do trato respiratório, preferivelmente por meio de administração pulmonar ou administração nasal.

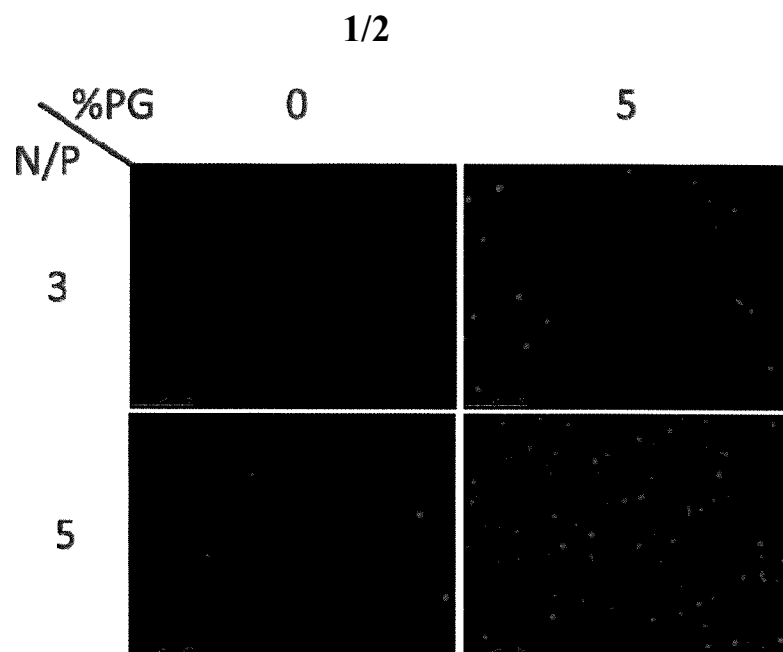


Figura 1

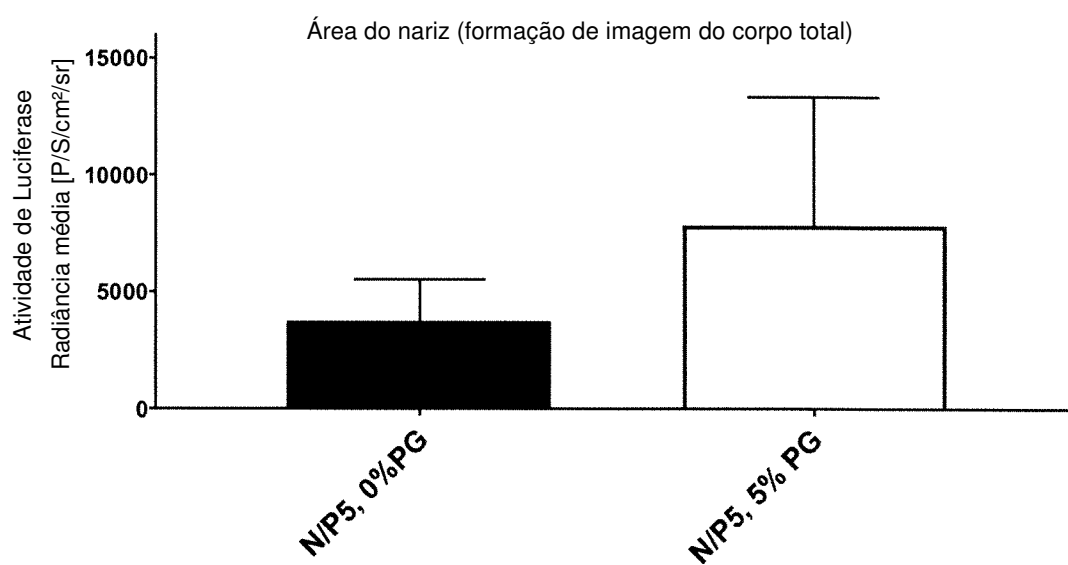


Figura 2

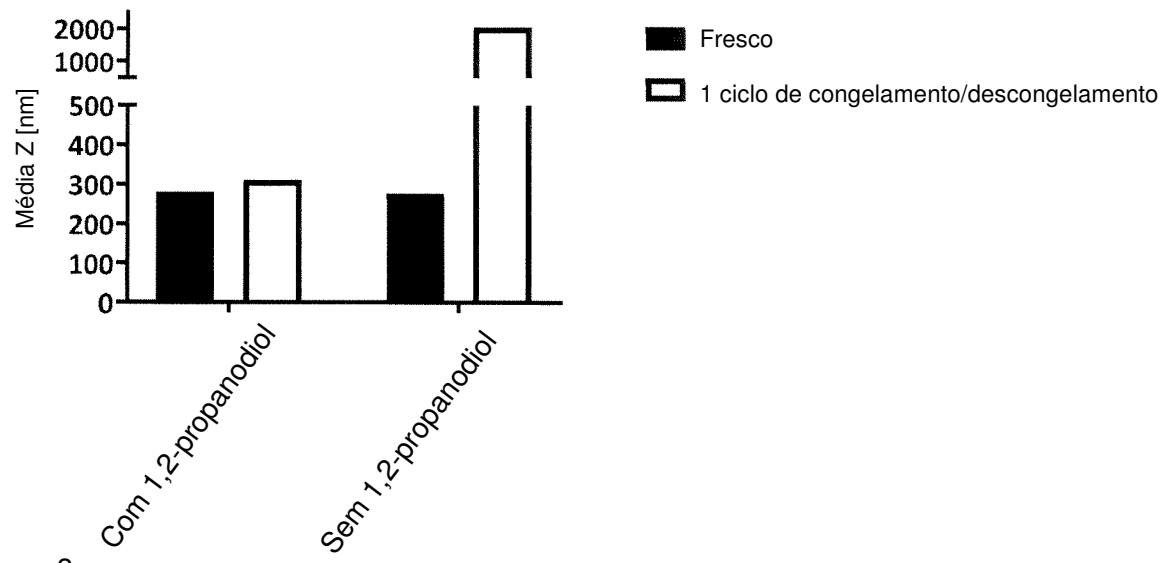


Figura 3

RESUMO**COMPOSIÇÃO, PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE UMA COMPOSIÇÃO, E, COMPOSIÇÕES SÓLIDA E PARA USO**

A invenção provê uma composição que é adequada para a distribuição de RNA, cuja composição compreende (i) partículas contidas em uma fase líquida, em que as partículas compreendem RNA e uma composição de lipídio, e (ii) 1,2 propanodiol. A composição de lipídio compreende (i-a) um derivado de colesterol, (i-b) um fosfoglicerídeo, e (i-c) um fosfoglicerídeo peguado. Adicionalmente são providos um método para preparar a composição, e uma composição sólida que é obtível congelando a composição em que partículas são contidas em uma fase líquida.