UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
Curso de Graduação em Farmácia-Bioquímica

A realidade emergente da terapia com RNAi: desafios e avanços

Gleicy Souza Morales

Trabalho de Conclusão do Curso de Farmácia-Bioquímica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo.

Orientador(a):
Profª. Drª. Jeanine Giarolla Vargas

São Paulo

2019

SUMÁRIO

Pág.

Lista de Abreviaturas 1

RESUMO 3

1. INTRODUÇÃO 5

2. OBJETIVOS 9

3. MATERIAL E MÉTODOS 10

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BIOGÊNESE DOS miRNAs E SILENCIAMENTO GÊNICO 11
4.2 ABORDAGEM TERAPÊUTICA BASEADA NO MECANISMO DE RNAi 13
4.2.1 PONTOS FAVORÁVEIS 13
4.2.2 PONTOS DESAFIADORES E SOLUÇÕES EM ESTUDO 14
4.2.2.1 CONJUGAÇÃO COM GalNAc 16
4.2.2.2 NANOPARTÍCULA LIPÍDICA 22
4.3 MEDICAMENTOS RNAi: ASPECTOS REGULATÓRIOS 28

5. CONCLUSÃO 31

7. BIBLIOGRAFIA 33

LISTA DE ABREVIATURAS

2’F	2’-deoxi-2’flúor
2’-Ome	2’-O-metil
AGO	proteína argonauta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ApoE	apolipoproteína E
ATTR	Amiloidose hereditária mediada por transtirretina
CDER	Centro de Avaliação e Pesquisa de Medicamentos
DGCR8 ou proteína Pasha	proteína ligadora de RNA
Dicer	endoribonuclease citoplasmática
Drosha	ribonuclease III
EMA	European Medicines Agency
EUA	Estados Unidos
FDA	Food and Drug Administration
GalNAc	N-acetilgalactosamina
ICH	International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use
MHLW	Ministry of Health, Labour and Welfare
miRNAs	microRNAs
pré-miRNAs	miRNAs precursores mais curtos
pri-miRNA	transcritos primários de miRNA
RanGTP	proteína nuclear de ligação a GTP
RISC	complexo de silenciamento induzido por RNA
RNA	ácido ribonucleico
RNAdf	RNA dupla fita
RNAi	interferência por RNA
RNAlnc	RNAs longos não codificantes
RNAm	RNA mensageiro
RNAncf	RNAs não codificadores funcionais
RNAr	RNAs ribossômicos
RNase	ribonuclease
RNAt	RNAs transportadores
SGPT	silenciamento gênico pós-transcricional

shRNA	pequenos RNAs dupla fita em formato de grampo
TCC	trabalho de conclusão de curso
TLR	receptores do tipo Toll
TTR	Transtirretina
UTR	região não traduzida
XPO5	enzima Exportina-5

RESUMO

MORALES, G. S. **A realidade emergente da terapia com RNAi: desafios e avanços**. 2019. no. f. Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia-Bioquímica – Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2019.

Palavras-chave: silenciamento gênico pós-transcricional, RNA interferente, terapia inovadora, soluções e desafios

INTRODUÇÃO: Descoberto no final da década de 90, o fenômeno de silenciamento gênico pós-transcricional (SGPT) desencadeado por RNA interferente tem sido intensamente estudado, visando sua aplicação em terapias de variadas patologias. Além de diferentes moléculas de origem endógena [ex: microRNAs (miRNAs)], o mecanismo de interferência por RNA pode ser iniciado através de pequenos RNAs interferentes gerados a partir de RNAs dupla fita exógenos introduzidos na célula. Esses são processados no citoplasma e, ao interagirem com o RNA mensageiro alvo por complementaridade de sequência de nucleotídeos, levam à degradação desse RNA ou à repressão de sua tradução, culminando no silenciamento do gene relacionado. Diante disso, terapias baseadas nesse mecanismo expandem o universo de moléculas passíveis de serem alvos terapêuticos, além de possuírem outras vantagens, as quais explicam os investimentos e rápida evolução no desenvolvimento de medicamentos desse tipo. Embora ainda existam soluções a serem melhoradas, em alguns países, já está disponível comercialmente o medicamento patisiran (Onpattro^{TM}), o qual é um pequeno RNA interferente. Assim, fica evidente que se trata de uma tecnologia extremamente inovadora, viável e com potencial de impactar positivamente a vida de inúmeros pacientes. OBJETIVOS: Apresentar uma revisão sobre terapia baseada no mecanismo de interferência por RNA, analisando-se soluções empregadas no seu desenvolvimento e desafios remanescentes. MATERIAL E MÉTODOS: Realizou-se uma pesquisa bibliográfica de artigos científicos publicados em base de dados online, tendo como foco a utilização do mecanismo celular de interferência por RNA no processo de regulação gênica para o desenvolvimento de terapias medicamentosas. Selecionaram-se os estudos quanto à existência de informações relevantes ao tema de revisão proposto. RESULTADOS: Sendo o mecanismo de regulação da expressão gênica por meio de RNA interferente intrínseco das células eucarióticas, descreve-se em detalhes a biogênese dos ácidos ribonucleicos envolvidos. Compreendendo a referida via celular, visualizam-se vantagens da abordagem terapêutica baseada no mecanismo mencionado como, a ação ocorrer de modo catalítico e a montante das terapias tradicionais e apresentar alta especificidade. Por outro lado, pontos desafiadores remanescentes ao desenvolvimento e expansão dessa tecnologia também são aqui analisados, dando enfoque aos relacionados com o alcance do sítio de ação pelo RNA interferente. Explora-se as estratégias de conjugação desse ao açúcar *N*-acetilgalactosamina trivalente (GalNAc) e o emprego de nanopartículas lipídicas. Quanto a primeira aborda-se gerações de conjugados em estudos bem como diferenças entre elas, já quanto a segunda, analisa-se,

principalmente, a química envolvida na formulação do medicamento Onpattro™. Diante dos pontos estudados nesse trabalho, verifica-se o grande potencial de fármacos conjugados com GalNAc chegarem ao mercado nos próximos anos. Já em relação aos aspectos regulatórios envolvidos nessa questão, observa-se que, hoje, ainda se carece de diretrizes regulatórias que abordem as expectativas/padrões de qualidade para os oligonucleotídeos de forma específica. CONCLUSÃO: Terapias com RNA interferentes já são uma realidade emergente e com potencial de transformação da medicina. Em poucos anos, partiu-se do estudo da biogênese dos miRNAs e da participação desses no silenciamento gênico pós-transcricional, para o desenvolvimento de fármacos aplicados no tratamento de diferentes patologias.

1. INTRODUÇÃO

A denominação “interferência por RNA (RNAi)”, correspondendo RNA do ácido ribonucleico no processo de regulação gênica, celular foi pensada, pela primeira vez, por Andrew Fire e Craig Mello, em 1998, através de um estudo publicado na revista *Nature* (FIRE et al, 1998). Neste, avaliou-se o efeito fenotípico decorrente da injeção de RNA no nematódeo *Caenorhabditis elegans* e, dentre as conclusões, levantou-se a hipótese de que o mecanismo de RNAi poderia fornecer uma explicação para o silenciamento gênico pós-transcricional (SGPT).

No mesmo ano, Fire proveu evidências de que o RNA mensageiro (RNAm) era o alvo do RNA dupla fita (RNAdf) injetado nas células (por meio de reconhecimento via cadeias complementares) e que era degradado antes de sua tradução, ou seja, o RNAdf exerce seu efeito a nível pós-transcricional (MONTGOMERY, XU, FIRE, 1998). Desde então, houve uma crescente expansão de conhecimentos sobre controle genético, cabendo ressaltar que a referida descoberta, no final da década de 90, culminou no Prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina de 2006 para Fire e Mello.

Hoje, entende-se que o mecanismo de interferência por RNA é conservado evolutivamente entre os eucariotos consistindo, sumariamente, na regulação da expressão de genes alvos a nível pós-transcricional por RNAs não codificadores funcionais (RNAncf). Dentre esses RNAs diversos, têm-se: microRNAs (miRNAs), RNAs transportadores (RNAt), RNAs ribossômicos (RNAr) e RNAs longos não codificantes (RNAlnc). Neste ponto, é importante ressaltar que sequências não codificadoras de proteínas correspondem a mais de 95% do DNA humano e que tais sequências podem ser transcritas e processadas em um grande número de RNAncf. Além dessas moléculas de origem endógena, o mecanismo de RNAi pode incluir pequenos RNAs interferentes gerados a partir de RNAdf introduzidos exogenamente (YU et al., 2019).

A biogênese dos miRNAs, abordada em maiores detalhes no item “*4. RESULTADOS E DISCUSSÃO”* deste trabalho, envolve processos que ocorrem dentro do núcleo celular, bem como etapas citoplasmáticas. Ao fim, gera-se um

miRNA maduro de única fita que pareia com sequências complementares presentes no RNA mensageiro alvo, culminando na degradação desse último e/ou inibição de sua tradução, com consequente silenciamento gênico (YU et al., 2019). Sabendo-se disso, é possível obter pequenos RNAs interferentes a partir da introdução, na célula, de RNAdf ou de vetores plasmidiais que codificam pequenos RNAs dupla fita em formato de grampo. Esses elementos exógenos são processados por integrantes da referida via de biogênese, gerando componentes similares ao miRNA maduro de única fita e resultando, também, em silenciamento gênico por interação com RNAs mensageiros (MOORE et al., 2010).

Mediante o exposto, têm-se que a partir do mecanismo de interferência por RNA, intrínseco da célula de eucariotos, há uma regulação da expressão gênica. Assim, uma vez que o referido mecanismo pode culminar no silenciamento de genes alvos específicos, diversos estudos têm sido realizados objetivando o desenvolvimento de terapias empregando RNAi contra doenças como infecções virais, câncer, desordens genéticas, etc (ZHOU, ZHANG, LIANG, 2014).

Até o momento, a maioria dos fármacos disponíveis no mercado são pequenas moléculas ou anticorpos, cujos alvos são proteínas derivadas do genoma. Nesse contexto, terapias baseadas no mecanismo de RNAi expandem o universo de moléculas passíveis de serem alvos terapêuticos. Ademais, a terapia envolvendo RNAi apresenta alta especificidade por envolver complementaridade de sequências de nucleotídeos, podendo, assim, possuir menos efeitos tóxicos frente às terapias convencionais (CHEN et al., 2018). Entretanto, além do mecanismo de ação diferenciado, a terapia com RNAi possui propriedades químicas e farmacocinéticas distintas das terapias convencionais (YU et al., 2019). Devendo os pequenos RNAs interferentes alcançar o citoplasma das células alvos para exercerem sua ação, se reconhece a existência de desafios relacionados, por exemplo, à entrega de modo seguro e eficaz destes fármacos no sítio de ação, bem como à depuração precipitada por RNAses e pelo sistema imunológico do paciente (CHEN et al., 2018). Além disso, destaca-se a necessidade do desenvolvimento de métodos para avaliação da biodistribuição sistêmica e localização subcelular (PECOT et al., 2011).

Em particular, quanto à limitação de alcance do sítio de ação pelo RNAi (hidrofílico e carregado negativamente), sistemas carreadores sintéticos se mostram alternativas interessantes (DONG et al., 2018). Estuda-se, por exemplo, a conjugação do pequeno RNA interferente ao açúcar *N*-acetilgalactosamina (GalNAc) (SPRINGER, DOWDY, 2018). Além disso, tem-se o encapsulamento do pequeno RNA interferente em uma nanopartícula lipídica sendo que, empregando essa tecnologia, têm-se como pioneiro da terapia com RNAi o medicamento patisiran (Onpattro^{TM}) aprovado em agosto de 2018 pelas agências regulatórias norte-americana (*Food and Drug Administration* - FDA) e europeia (*European Medicines Agency* - EMA) e em junho de 2019 pela japonesa (*Ministry of Health, Labour and Welfare* – MHLW) (*Alnylam Pharmaceuticals, Inc*, 2018, 2019).

O referido medicamento é indicado, nos Estados Unidos (EUA) e Japão, para o tratamento da polineuropatia da amiloidose hereditária mediada por transtirretina em adultos e, na União Europeia, para o tratamento da amiloidose hereditária mediada por transtirretina em adultos com polineuropatia de estádio 1 ou 2. Resumidamente, a amiloidose hereditária mediada por transtirretina é uma doença rara (prevalência global estimada em 50.000 indivíduos), muitas vezes fatal. Nesta, tem-se a produção, pelo fígado, de uma forma mutada da proteína tetramérica transtirretina, a qual favorece seu depósito como fibrilas amiloides insolúveis em múltiplos órgãos (coração, nervos, etc). Diante disso, patisiran é um pequeno RNA interferente de cadeia dupla que possui como alvo uma sequência conservada entre os RNAs mensageiros da transtirretina selvagem, bem como das variantes da referida proteína. Assim, reduz-se a síntese hepática da transtirretina mutada e selvagem, depletando o depósito protéico nos órgãos (KRISTEN et al., 2018). A terapia com RNAi, em suma, interfere na causa raiz da doença e, portanto, não se restringe a retardar a progressão da patologia ou tratar seus sintomas.

Além do medicamento citado, existem diversos outros estudos, pré-clínicos e clínicos, em andamento para aplicação da terapia com RNAi para outras patologias. Alguns exemplos estão relacionados à hipercolesterolemia, vários tipos de câncer, hepatite, etc (DAS, MUSETTI, HUANG, 2018).

Dessa forma, fica evidente a inovação disruptiva que a terapia baseada no mecanismo de interferência por RNA representa. Completando 21 anos, em 2019, de descoberta do mecanismo de RNAi, muito se tem investido na utilização desse. Emprega-se em pesquisas de função de proteínas através da repressão da expressão, seletivamente, de genes de interesse em culturas de células e modelos animais, bem como no desenvolvimento de terapias principalmente contra doenças graves (BENDER, 2014).

2. OBJETIVOS

Este trabalho de conclusão de curso (TCC) almeja apresentar uma revisão sobre terapia baseada no mecanismo de interferência por RNA. Apesar de passados apenas 21 anos desde a descoberta desse mecanismo, já se dispõe de um medicamento no mercado cuja ação é pautada no silenciamento gênico por RNA interferente. Assim, tendo em vista desafios que o desenvolvimento da inovadora terapia apresentava, busca-se analisar as soluções empregadas para o referido medicamento, discutir as barreiras remanescentes à expansão da aplicação desta terapia, estratégias estudadas para superá-las e o que se esperar da terapia com RNAi.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Possuindo como enfoque o emprego do mecanismo celular de interferência por RNA no processo de regulação gênica para o desenvolvimento de terapias medicamentosas, realizou-se uma revisão de artigos científicos publicados.

Os artigos científicos utilizados encontravam-se disponíveis no portal *PubMed* e na base de dados *Web of Science.* Alguns dos termos utilizados na pesquisa foram “RNAi”, “therapy” (terapia) e “delivery”. Deu-se preferência às publicações científicas recentes e cabe ressaltar que restrições de idioma foram aplicadas, consultando-se apenas artigos nos idiomas inglês e português.

Os estudos obtidos através da pesquisa foram avaliados e selecionados quanto às informações de maior relevância e pertinência ao tema de revisão deste trabalho. Algumas das referências citadas nesses estudos também foram incluídas na avaliação, caso fossem apropriadas à revisão proposta.

No total, 30 artigos foram consultados para compor esse trabalho de revisão.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 BIOGÊNESE DOS miRNAs E SILENCIAMENTO GÊNICO

Uma vez que o mecanismo de regulação da expressão gênica através de interferência por RNA é intrínseco das células eucarióticas, é importante que se entenda a biogênese dos RNAs envolvidos.

Conforme a *FIGURA 1* a seguir, dentro do núcleo celular, inicialmente tem-se a transcrição de genes codificadores de miRNA pela RNA polimerase II, originando transcritos primários de miRNA, denominados pri-miRNA (YU et al., 2019). Esses são clivados pelo complexo Microprocessador composto pela ribonuclease (RNase) III denominada Drosha e pela proteína ligadora de RNA, DGCR8 ou proteína Pasha, dando origem a miRNAs precursores mais curtos (pré-miRNAs). Por outro lado, alguns pré-miRNAs são provenientes diretamente de íntrons originados pelo processo de *splicing* de transcritos de genes codificadores de proteínas (KIM, Y.-K; KIM, B; KIM, V. N, 2016). Após serem exportados do núcleo para o citoplasma pelo complexo proteína nuclear de ligação a GTP (RanGTP) e pela enzima Exportina-5 (XPO5), os pré-miRNA são processados pela endoribonuclease citoplasmática Dicer, originando miRNA de fita dupla. Esse miRNA duplex é, então, incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), do qual proteínas argonautas (AGO) fazem parte e onde as duas fitas do miRNA são separadas. Com base na estabilidade termodinâmica relativa das duas extremidades do duplex, a fita cujos nucleotídeos da extremidade 5' são menos estáveis é selecionada como miRNA maduro (fita anti-senso, guia), permanecendo associada ao complexo RISC enquanto a outra fita (fita senso, passageira) é degradada (KIM, Y.-K; KIM, B; KIM, V. N, 2016). A seguir, a fita do miRNA selecionada pareia com a região homóloga do mRNA-alvo [geralmente na região 3’ não traduzida (UTR)] por complementaridade de bases, que, se total, leva à degradação do mRNA e, se parcial, tem-se repressão da tradução do mRNA (FRANÇA, 2010).

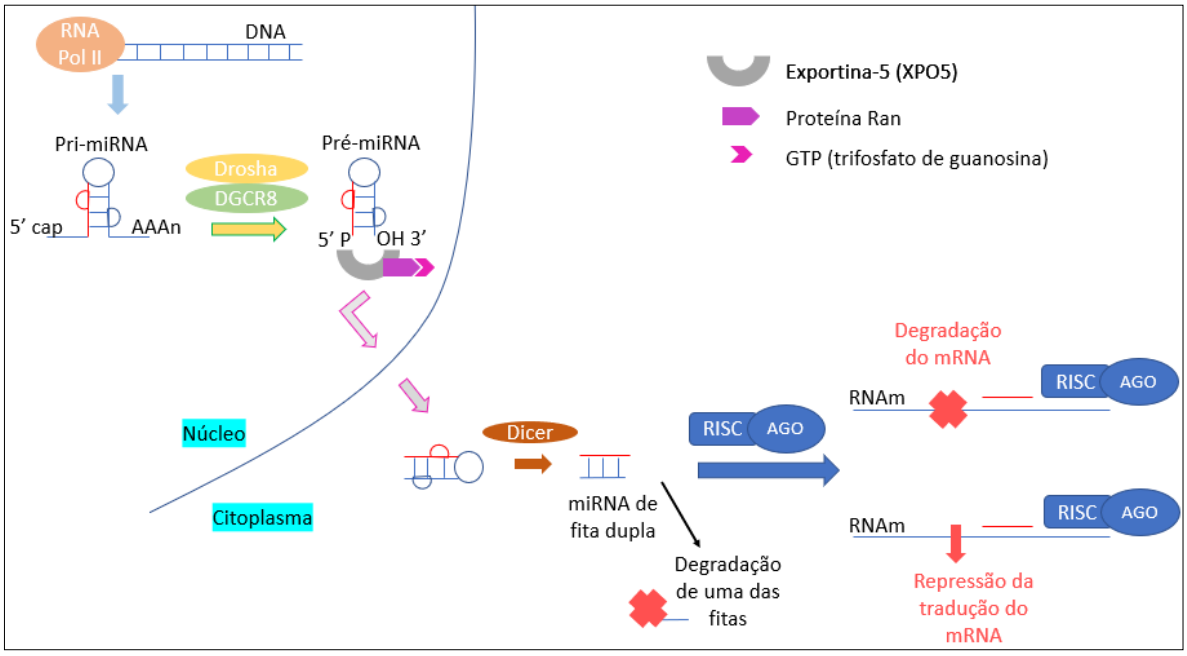

FIGURA 1. Esquematização da biogênese dos miRNAs.

De modo semelhante ao descrito acima, RNAdf exógenos introduzidos na célula são processados pela enzima Dicer, originando pequenos RNAs interferentes. Estes últimos são, habitualmente, formados por uma fita senso e uma anti-senso compostas por 21 e 23 nucleotídeos respectivamente, havendo uma saliência de 2 nucleotídeos na extremidade 3' da fita anti-senso (HUANG, 2017). Da mesma forma que os miRNAs, interagem com o complexo RISC, no qual haverá a clivagem de uma das fitas e o pareamento da outra à sequências complementares presentes no RNA mensageiro alvo. Este, então, sofre degradação, culminando no silenciamento do gene alvo (FRANÇA, 2010).

Além disso, existe a possibilidade de introdução de pequenos RNAs interferentes nas células através de vetores plasmidiais que codificam pequenos RNAs dupla fita em formato de grampo (shRNA, do inglês *short hairpin RNA*) junto a um promotor da RNA polimerase II ou III. O transcrito pode ser processado pela Dicer, gerando pequenos RNAs interferentes (FRANÇA, 2010; HUYNH, MADU, LU, 2018). Neste caso, porém, existem etapas adicionais que devem ser consideradas: eficiência de chegada do DNA plasmidial no núcleo celular, integração da sequência codificadora do shRNA ao genoma da célula, bem como

a correta transcrição da sequência (YU et al., 2019). Por outro lado, tem-se como uma das vantagens a obtenção de células com gene alvo silenciado de forma mais duradoura e estável (MOORE et al., 2010).

4.2 ABORDAGEM TERAPÊUTICA BASEADA NO MECANISMO DE RNAi

4.2.1 PONTOS FAVORÁVEIS

A partir do silenciamento gênico seletivo, o emprego do mecanismo de RNAi tem proporcionado grandes avanços para estudos que buscam avaliar a função de genes e suas respectivas proteínas. Além disso, essa via de regulação da expressão gênica, naturalmente presente nas células dos mamíferos, se mostrou potencial via biológica explorável para o desenvolvimento de terapias medicamentosas para doenças que possuem como causa ou fator contribuinte, expressão gênica anômala (FRANÇA, 2010).

Atualmente, para além do medicamento patisiran, recém aprovado por três importantes agências regulatórias, algumas terapias investigativas baseadas no referido mecanismo se encontram em estágio avançado de desenvolvimento clínico, conforme abordado no tópico "*4.2.2.1 CONJUGAÇÃO COM GalNAc*" deste trabalho. Isso porque a terapia baseada no mecanismo de RNAi apresenta vantagens, se comparada às outras estratégias terapêuticas até então existentes (*Alnylam Pharmaceuticals, Inc*).

A maioria dos fármacos possui como alvo proteínas, sejam essas defeituosas ou presentes em quantidades inadequadas, enquanto a terapêutica com RNAi interfere na síntese proteica. Nesse sentido, essa ação diferenciada ocorre a montante de terapias tradicionais, as quais atuam em etapas posteriores na patogênese da doença. Em suma, utilizando-se interferência por RNA intervém-se na causa raiz da patologia (KIM, Y.-K; KIM, B; KIM, V. N, 2016).

Uma vez que o RNAm transcrito de qualquer gene pode ser alvo de um pequeno RNA interferente projetado, torna-se possível interferir na rota de síntese de uma proteína que, anteriormente, não era afetada por outros fármacos

disponíveis. Ademais, o mecanismo de RNAi pode se mostrar eficiente nos casos de doenças decorrentes de mutação em um único alelo, não atuando sobre o gene alelo normal. O motivo dessa vantagem é decorrente da alta especificidade de ação dos pequenos RNAs interferentes, devido à interação com os RNAsm alvos ocorrer por pareamento de bases (*Alnylam Pharmaceuticals, Inc*).

Por fim, a ação de pequenos RNAs interferentes é catalítica. Isso porque o complexo RISC, mais especificamente a proteína AGO2 que o compõe, requer apenas um pequeno RNA interferente para clivar uma grande quantidade de mRNAs alvo. Dessa maneira, a potência elevada do mecanismo de interferência por RNA culmina na necessidade de pequena quantidade de moléculas efetoras (LIEBERMAN, 2018; AAGAARD, ROSSI, 2007).

Apesar das características do mecanismo de interferência por RNA, anteriormente citadas, serem favoráveis ao desenvolvimento de novas terapias, cabe ressaltar que existem alguns pontos desafiadores quanto à sua aplicação clínica. A seguir, serão discutidos alguns dos pontos de objeção ao desenvolvimento e aplicação de terapias disruptivas pautadas no mecanismo de RNAi.

4.2.2 PONTOS DESAFIADORES E SOLUÇÕES EM ESTUDO

Pequenos RNAs interferentes apresentam, de modo geral, propriedades farmacocinéticas desfavoráveis. Além da presença de RNAses no meio extra e intracelular, as quais degradam os pequenos RNAs interferentes rapidamente, faz-se necessário o desenvolvimento de métodos que permitam que o RNA, uma molécula carregada negativamente, atravesse membranas hidrofóbicas e alcance o interior das células.

Ademais, pode haver a ativação do sistema imune inato em decorrência do reconhecimento do ácido nucléico exógeno, por exemplo, por receptores do tipo Toll (TLR), especificamente TLR3, TLR7 e TLR8 (SPRINGER, DOWDY, 2018). Além disso, pode-se observar a existência de efeitos *off-targets*, por hibridização com outros RNAs, que não o alvo, que apresentam complementaridade parcial

com a fita anti-senso do pequeno RNA interferente exógeno (JANAS et al., 2018a). Como exemplo tem-se a supressão de alvos homólogos não intencionais, ativação de vias de reparo do DNA e translocações ou edições imprecisas de genes.

Mediante a existência desses pontos desafiadores, tem-se buscado formas de superá-los. A fim de se melhorar a estabilidade do pequeno RNA interferente e de se reduzir a ativação do sistema imunológico inato, modifica-se a estrutura química desse ácido nucleico *(FIGURA 2)*. Modificações na posição 2’ do açúcar ribose dos nucleotídeos, através da incorporação de 2’-*O*-metil (2’-OMe) e 2’-desoxi-2’flúor (2’F), preservam semelhanças às propriedades biofísicas do grupo 2’-OH e diminuem a degradação do pequeno RNAi por RNAses. Verifica-se, também, que a introdução de um ou vários fosforotioatos nas extremidades 5’ e 3’ de cada fita aumenta, significativamente, a estabilidade do RNAi frente à degradação por nucleases e eleva sua ligação às proteínas séricas, resultando em maior potência e durabilidade da resposta ao pequeno RNA interferente *in vivo* (LIEBERMAN, 2018; JANAS et al., 2018b; SPRINGER, DOWDY, 2018; SHEN, COREY, 2018).

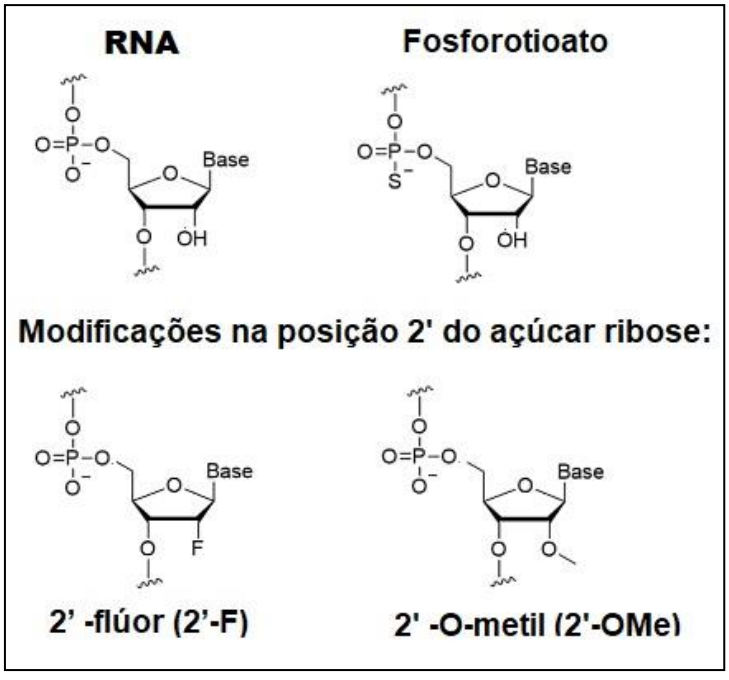

FIGURA 2. Modificações na molécula de RNA. Adaptado de SHEN, COREY, 2018.

No que diz respeito ao alcance do sítio de ação pelo RNAi, diversas estratégias têm sido estudadas. Avalia-se o emprego de vetores virais para pequenos RNAs dupla fita em formato de grampo (shRNAs), os quais, porém, geram preocupações relacionadas à imunogenicidade do vetor (DONG et al., 2018), bem como o uso de sistemas carreadores sintéticos, que apresentam vantagens como escalabilidade industrial (DANA et al., 2017).

4.2.2.1 CONJUGAÇÃO COM GalNAc

Uma das estratégias de *delivery* que utilizam sistemas carreadores sintéticos consiste na conjugação do pequeno RNA interferente ao açúcar *N*-acetilgalactosamina trivalente (GalNAc) (*FIGURA 3*). A partir dessa modificação química no ácido nucleico, explora-se a ávida ligação do referido açúcar ao receptor de asialoglicoproteína, predominantemente expresso na membrana dos hepatócitos. Cabe ressaltar que se verificou uma dependência da interação açúcar-receptor quanto ao pH e à presença de Ca^{2+} e que o número de resíduos de N-acetilgalactosamina, bem como sua disposição espacial, influenciam na ligação com o receptor de asialoglicoproteína (SPRINGER, DOWDY, 2018). Ocorrida a ligação, o conjugado açúcar-pequeno RNAi sofre endocitose mediada por clatrina e, posteriormente, há redução do pH durante a maturação endossomal. Com isso, GalNAc dissocia-se e é degradado, o receptor de asialoglicoproteína é reciclado na superfície celular e, através de um mecanismo ainda desconhecido, uma pequena fração do pequeno RNA interferente livre (< 1%) atravessa a bicamada lipídica do endossomo, alcançando o citoplasma do hepatócito e podendo interferir na via de regulação da expressão gênica pelo mecanismo de interferência por RNA *(FIGURA 4)* (SPRINGER, DOWDY, 2018).

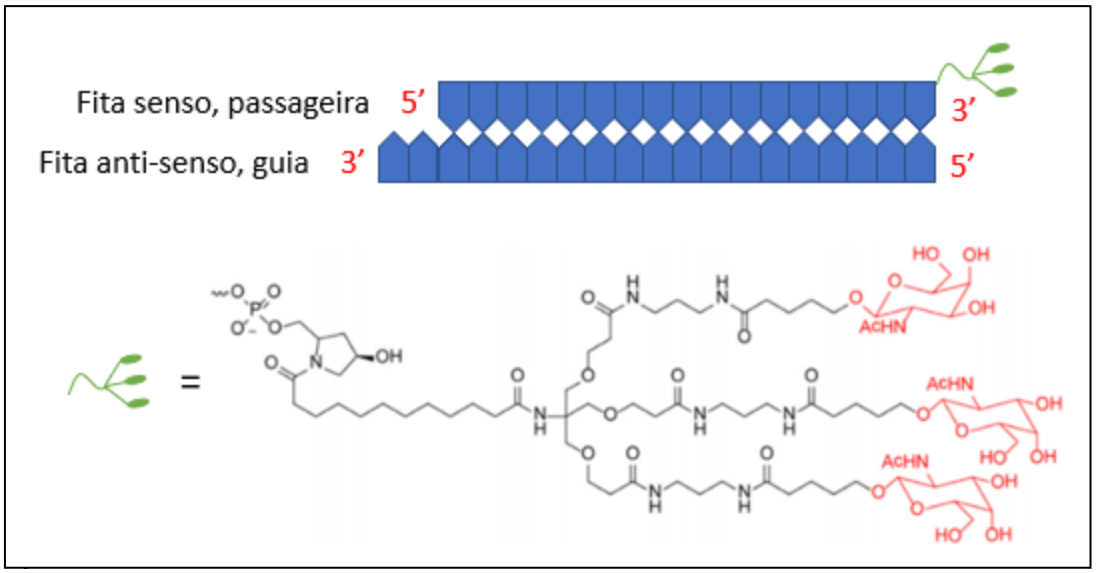

FIGURA 3. Conjugação do pequeno RNA interferente ao açúcar *N*-acetilgalactosamina trivalente (GalNAc)

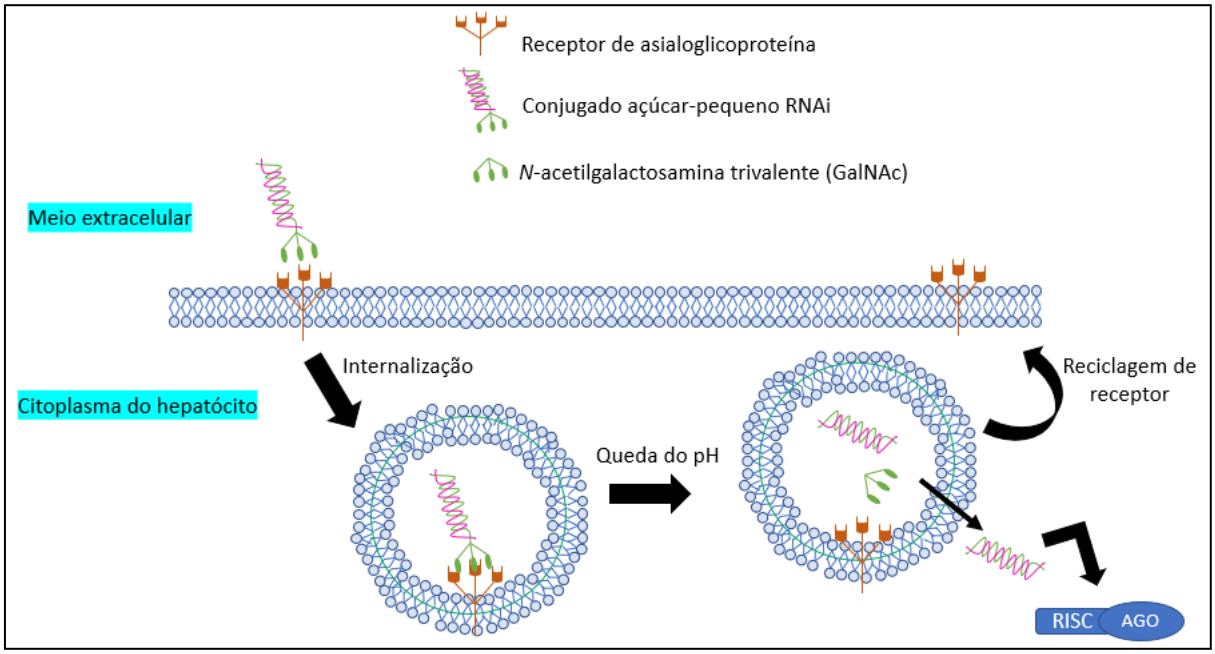

FIGURA 4. Entrega dos conjugados GalNAc-pequenos RNAi nos hepatócitos.

Cabe ressaltar que existem alguns pontos de atenção importantes para a expansão do emprego dessa estratégia para outros pares ligante-receptores. O receptor de asialoglicoproteína é expresso em níveis anormalmente altos na

superfície dos hepatócitos e as taxas de internalização e reciclagem dos receptores podem ser fatores limitantes (SHEN, COREY, 2018).

Utilizando-se dessa estratégia de *delivery,* pode-se dividir os pequenos RNAs interferentes conjugados com GalNAc em três gerações. Compondo a primeira geração tem-se o revusiran, estudado para o tratamento de amiloidose hereditária mediada por transtirretina com cardiomiopatia. Esse contém duas ligações fosforotioato na extremidade 3’ da cadeia anti-senso, bem como foi totalmente modificado com substituições de 2’-OH por 2’-F ou 2’-OMe (HUANG, 2017).

No final do ano de 2016, a empresa farmacêutica Alnylam anunciou a descontinuação do desenvolvimento do revusiran. Após resultados positivos no estudo de extensão de fase 2 aberta, a decisão foi pautada em um desequilíbrio de mortalidade no braço revusiran (17 mortes) comparado ao braço placebo (2 mortes). Embora não se tenha encontrado evidência conclusiva de associação do fármaco testado à neuropatia no estudo fase 3 ENDEAVOUR, avaliou-se que o perfil risco-benefício do revusiran não mais suportava continuação de aplicação do fármaco (HUANG, 2017).

Já na segunda geração dos conjugados, empregou-se a denominada “química de estabilização aprimorada”. De modo geral, tem-se a adição de quatro ligações fosforotioato terminais (2 ligações em cada uma das extremidades 5’) e maior conteúdo de 2’-OMe do que de 2’-F. Tais modificações na molécula do pequeno RNA interferente provêm melhora substancial de potência e duração de atividade, as quais culminam em uma redução de dose e de frequência de administração do fármaco. Além disso, aumenta-se, significativamente, a estabilidade metabólica do ácido nucleico, tornando-o mais resistente à ação de endo- e exonucleases intracelulares, reduzindo, assim, a possibilidade de que nucleotídeos e/ou nucleosídeos modificados gerados pela sua metabolização possam fazer parte dos pools de nucleotídeos e nucleosídeos endógenos na célula (JANAS et al., 2019).

Em 2017, no 13º Encontro Anual da Sociedade de Terapêutica com Oligonucleotídeos, a empresa farmacêutica Alnylam apresentou dados pré-clínicos

que envolviam a “química de estabilização aprimorada plus”. Essa tecnologia visa melhorar, ainda mais, a especificidade do pequeno RNA interferente, ao mesmo tempo em que se mantém sua potência e duração. Incluiu-se uma modificação de ácido nucleico glicol próximo da extremidade 5’ (nucleotídeos 2 a 8) da fita anti-senso do RNA, culminando na desestabilização do pareamento dirigido por tal região com transcritos parcialmente complementares. Dessa forma, reduz-se potenciais efeitos off-target ao mesmo tempo que se mantém o pareamento correto com o alvo e atividade (JANAS et al., 2018b). Além disso, o conteúdo de 2’-F foi reduzido apenas à presença em cerca de 9-10 posições [algumas dessas essenciais (ex: posição 2 da fita anti-senso], sendo o restante apresentando 2’-OMe (SPRINGER, DOWDY, 2018). Por fim, algumas outras modificações químicas também foram investigadas, como por exemplo a incorporação de 5’-vinilfosfonato (SPRINGER, DOWDY, 2018).

A partir do exposto, nas *TABELAS I* e *II* a seguir têm-se, respectivamente, um comparativo químico entre gerações de conjugados RANi-GalNAc e moléculas em desenvolvimento que utilizam essa estratégia de *delivery*.

TABELA I. Comparativo químico resumido entre gerações de conjugados RNAi-GalNAc

Geração	**Denominação em inglês**	**Modificações químicas (principais)**	**Referência**
1ª	Standard Template Chemistry (STC)	Adição de duas ligações fosforotioato na extremidade 3’ da cadeia anti-senso	HUANG, 2017
		2’-OH substituído por 2’-F ou 2’-Ome	
2ª	Enhanced Stabilization Chemistry (ESC)	Adição de duas ligações fosforotioato em cada uma das extremidades 5’	JANAS et al., 2019
		Maior conteúdo de 2’-OMe do que de 2’-F	
3ª	Enhanced Stabilization Chemistry Plus (ESC+)	Inclusão da modificação de ácido nucleico glicol próximo da extremidade 5’ (nucleotídeos 2 a 8) da fita anti-senso do RNA	JANAS et al., 2018b SPRINGER, DOWDY, 2018
		Redução do conteúdo de 2’-F, com a presença em cerca de 9-10 posições, sendo o restante apresentando 2’-OMe	

TABELA II. Moléculas em desenvolvimento que utilizam a estratégia de delivery do conjugado “pequeno RNAi-GalNAc”.

Nome da molécula	**Alvo**	**Patologia**	**Geração de conjugado RNAi-GalNAc**	**Fase de desenvolvimento**	**Referências**
Revusiran	Transtirretina (TTR) mutante e selvagem	Amiloidose hereditária mediada por transtirretina com cardiomiopatia	1ª	Descontinuado durante estudo clínico de fase III - ENDEAVOUR	HUANG, 2017
Fitusiran	Antitrombina	Hemofilia e Distúrbios hemorrágicos Raros	2ª	Em estudo clínico de fase II e III	ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03974113 ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03549871 ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03754790 ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03417102 ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03417245
Inclisiran	Serina protease PCSK9	Hipercolesterolemia	2ª	Em estudo clínico de fase II e III	ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03851705 ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03814187 ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03705234
Givosiran	Ácido aminolevulínico sintase 1 (ALAS1)	Porfiria hepática aguda	2ª	Processo de registro submetido à FDA (junho/2019)	Alnylam Pharmaceuticals, Inc.*

Vutrisiran	Transtirretina (TTR) mutante e selvagem	Amiloidose hereditária mediada por transtirretina (ATTR)	2ª	Em estudo clínico de fase III	ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03759379
Lumasiran	Hidroxiácido oxidase 1 (HAO1) hepática	Hiperoxalúria primária tipo 1	2ª	Em estudo clínico de fase III e estudo de extensão de fase II aberta	ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03905694 ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03350451
Cemdisiran	Proteína C5 do sistema complemento	Doenças mediadas pelo sistema complemento	2ª	Em estudo clínico de fase II	ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03841448
ALN-AAT02	Alfa-1 antitripsina (AAT)	Deficiência hepática de alfa-1 antitripsina	3ª	Em estudo clínico de fase I/II	ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03767829
ALN-HBV02 (VIR-2218)	Genoma do vírus da hepatite B (HBV)	Infecção crônica pelo Vírus da Hepatite B	3ª	Em estudo clínico de fase I/II	ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03672188
ALN-AGT	Angiotensinogênio (AGT)	Hipertensão em populações especiais como: pacientes com hipertensão resistente ou refratária, doença renal crônica ou insuficiência cardíaca	3ª	Em estudo clínico de fase I	ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03934307

*Disponível em: http://investors.alnylam.com/news-releases/news-release-details/alnylam-completes-rolling-submission-new-drug-application-us.

Acesso em: 29 jun. 2019

4.2.2.2 NANOPARTÍCULA LIPÍDICA

Outra estratégia de *delivery* dos pequenos RNAs interferentes envolve a utilização de nanopartículas. Para tanto, estudos relacionados a diversas características dessas veem sendo realizados. Fatores como tamanho, formato, carga superficial, densidade e composição das nanopartículas podem influenciar na obtenção de um sistema carreador seguro e eficaz (DRAZ et al., 2014). O formato, por exemplo, influencia na internalização celular por endocitose, enquanto que o tamanho correto pode reduzir a depuração e filtração por sistemas renais e hepáticos, aumentando o tempo de meia vida do fármaco e, por fim, características de superfície apropriadas melhoram a captura pelas células e minimizam reconhecimento das nanopartículas pelo sistema imunológico do paciente (TATIPARTI et al., 2017).

Visando uma associação estável do pequeno RNAi com as nanopartículas, existem algumas possibilidades: complexação, encapsulamento e associação não covalente. Dessa forma, cabe ressaltar que a eficácia, vantagens e desvantagens dos diferentes sistemas de nanopartículas variam e são decorrentes da composição, bem como das características físicas e químicas desses (DRAZ et al., 2014). Alguns exemplos de sistemas são os que empregam nanopartículas poliméricas e nanopartículas lipídicas, sendo essas últimas focadas neste trabalho.

O encapsulamento do pequeno RNAi em nanopartículas lipídicas possui vantagens e desvantagens. Dentre as primeiras podem-se citar a proteção do pequeno RNA interferente, aumento de sua meia vida sérica, melhoria da sua internalização pelas células, possibilidade de síntese em larga escala e de projeção para escape do endossomo, antes que ocorra a metabolização do pequeno RNAi nos lisossomos. Por outro lado, como desvantagens, têm-se maior complexidade de formulação, manufatura dispendiosa financeiramente e necessidade de conjugação com ligantes específicos para *delivery* tecido-específica (SHEN, COREY, 2018; TIEMANN, ROSSI , 2009). Cabe ressaltar que existem variados tipos de lipídeos que podem ser empregados na construção da

nanopartícula, podendo-se obter diferentes graus de rigidez e flexibilidade da bicamada lipídica. Além disso, pode-se peguilar a nanopartícula a fim de se prolongar sua circulação *in vivo* (DRAZ et al., 2014).

Utilizando a estratégia de encapsulamento do pequeno RNAi em uma nanopartícula lipídica tem-se o medicamento patisiran (Onpattro^{TM}) aprovado nos EUA, Europa e Japão para o tratamento da polineuropatia da amiloidose hereditária mediada por transtirretina em adultos. Essa é uma doença autossômica dominante, progressiva e potencialmente fatal, causada por mutações no gene que codifica a proteína transtirretina (TTR) (KRISTEN et al., 2018).

A transtirretina é uma proteína tetramérica plasmática predominantemente sintetizada no fígado, sendo responsável, principalmente, pelo transporte de vitamina A e por aproximadamente 15% da tiroxina circulante no plasma. Em pacientes com amiloidose hereditária mediada por transtirretina, mutações nessa proteína favorecem desestabilização do tetrâmero e sua remodelação proteolítica, levando à formação de agregados de fibrilas amiloides altamente ordenados e anormais. Ocorre um acúmulo de TTR com conformação alterada em múltiplos locais, os quais incluem nervos, coração e trato gastrointestinal, culminando em neuropatia sensório-motora periférica e, em muitos casos, neuropatia autonômica e/ou cardiomiopatia. Cabe ressaltar que os depósitos amiloides contém, no geral, TTR selvagem e mutada misturadas, uma vez que a maioria dos pacientes são heterozigotos para as mutações de transtirretina (KRISTEN et al., 2018).

Patisiran possui um mecanismo de ação diferenciado. Esse pequeno RNA interferente tem como alvo uma sequência na região não traduzida do RNA mensageiro da proteína transtirretina, conservada entre as formas selvagem e todas as variantes da TTR. O medicamento é administrado via intravenosa, 1 vez a cada 3 semanas, sendo a dose calculada de acordo com a massa corporal do paciente. Diariamente o indivíduo recebe suplemento oral de vitamina A e, visando reduzir a ocorrência de reações relacionadas à infusão do patisiran, o paciente recebe antes de cada infusão: dexametasona, bloqueadores H1 e H2 e acetaminofeno (KRISTEN et al., 2018).

Conforme se retrata na *FIGURA 5* a seguir, após a infusão do patisiran, as nanopartículas lipídicas são opsonizadas pela apolipoproteína E (ApoE), penetram no fígado através das fenestras do endotélio e se ligam aos receptores de ApoE na superfície dos hepatócitos. Ocorre, então, endocitose, fusão da nanopartícula com a membrana endossomal devido à ionização do seu componente lipídico, com liberação do pequeno RNA interferente no citoplasma. Esse é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), no qual ocorre a separação das fitas do RNA duplex, permanecendo a fita anti-senso no complexo. Esse, por fim, se associará ao RNA mensageiro alvo, através de complementaridade de bases entre a fita do patisiran e a sequência conservada na região 3' não traduzida do RNA mensageiro da TTR. Ocorre degradação catalítica de RNAs mensageiros codificadores de TTR selvagem e mutada, reduzindo as sínteses de ambas as proteínas (KRISTEN et al., 2018).

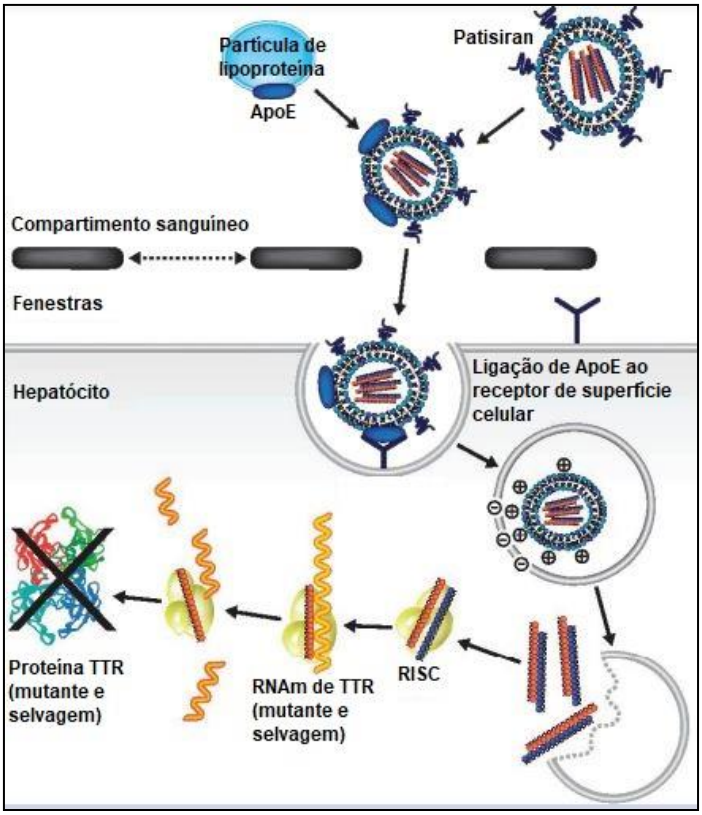

FIGURA 5. *Delivery* e mecanismo de ação do patisiran. RISC: complexo de silenciamento induzido por RNA; RNAi: RNA interferente; TTR: transtirretina (KRISTEN et al., 2018).

Pós-infusão do patisiran, observa-se sua distribuição majoritariamente no fígado, em detrimento a outros órgãos que possuem endotélio fenestrado (ex: baço), não havendo evidências de penetração no sistema nervoso central. O referido fármaco é eliminado, principalmente, através de metabolização em nucleotídeos de vários comprimentos por nucleases, sendo menos de 1% da dose administrada excretada inalterada na urina (KRISTEN et al., 2018).

Em termos de estrutura química e formulação, patisiran é um oligonucleotídeo de cadeia dupla composto por 21 nucleotídeos em cada uma das fitas (senso e anti-senso), sendo essas hibridizadas através de 19 pares de bases (*FIGURA 6*). Já o produto acabado, é constituído pelo patisiran encapsulado em nanopartículas lipídicas suspensas em um tampão fosfato-salino. Fazem parte das nanopartículas os excipientes lipídicos: DLin-MC3-DMA (lipídio catiônico ionizável), DSPC (fosfolipídio), colesterol e PEG_{2000}-C-DMG (lipídio de revestimento). A molécula anfifílica DLin-MC3-DMA promove a automontagem dos componentes da formulação em nanopartículas, encapsulando o pequeno RNA interferente ao interagir eletrostaticamente com o ácido nucleico polianiônico. Além disso, permite que o RNAi escape do compartimento endossomal após endocitose (JAYARAMAN et al., 2012). O DSPC interage com o fosfato do ácido nucleico por meio de seu grupo colina. O colesterol é disperso, uniformemente, entre o núcleo e a superfície da nanopartícula e o lipídio peguilado é distribuído, predominantemente, na superfície dessa (TAM, CHEN, CULLIS, 2013). Uma vez administrado o medicamento, PEG_{2000}-C-DMG se dissocia da superfície das nanopartículas lipídicas, permitindo que essas interajam com a apolipoproteína E circulante, facilitando sua captura pelas células (*FIGURAS 7 e 8)*.

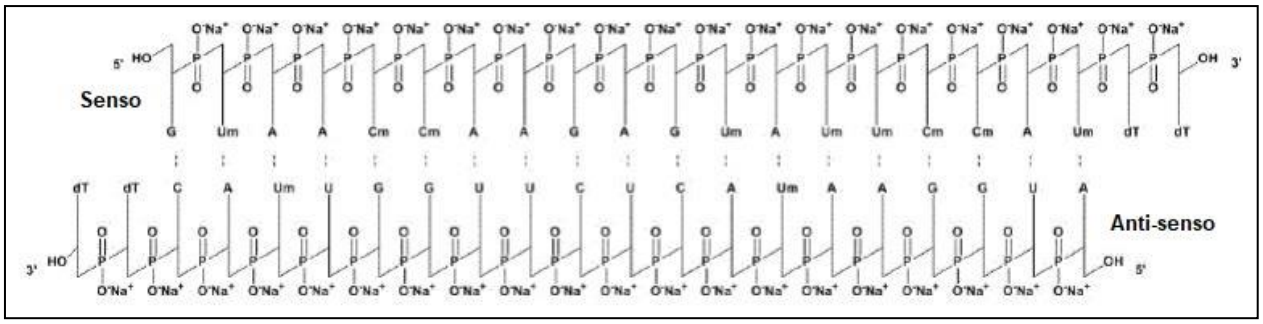

FIGURA 6. Fórmula estrutural do patisiran. A: adenosina; C: citidina; G: guanosina; U: uridina; Cm: 2′-*O*-metilcitidina; Um: 2′-*O*-metiluridina; dT: timidina. Adaptado de RxList.

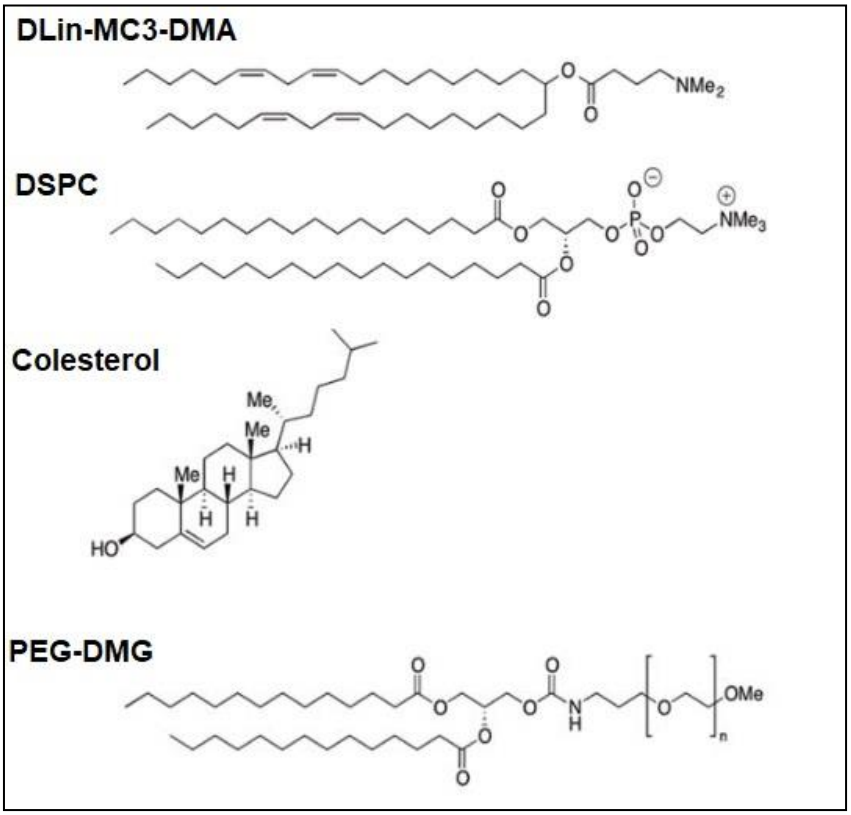

FIGURA 7. Estrutura química dos constituintes da nanopartícula lipídica do produto acabado Onpattro™. Adaptado de TAM, CHEN, CULLIS, 2013.

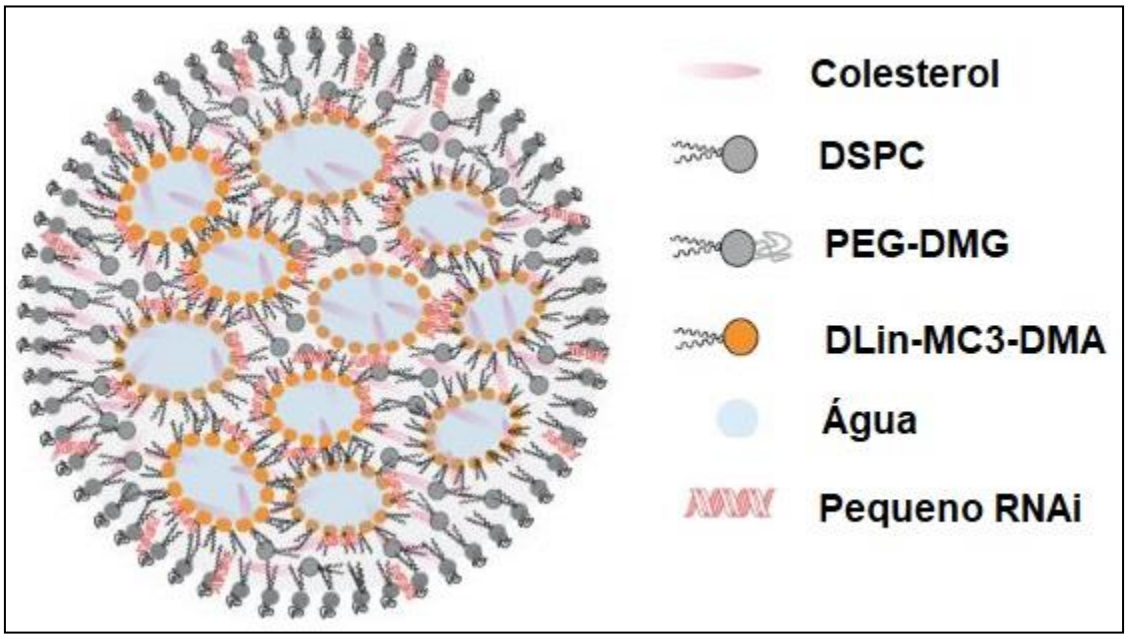

FIGURA 8. Representação esquemática da nanopartícula lipídica contendo o pequeno RNA interferente. Adaptado de VIGER-GRAVEL et al., 2018.

Até a aprovação do patisiran por agências regulatórias, as opções terapêuticas para os pacientes acometidos pela referida patologia eram: 1) medicamentos para alívio dos sintomas como: dor neuropática (gabapentina), distúrbios de motilidade gastrointestinal (metoclopramida) e cardíaco relacionados (β-bloqueadores, diuréticos de alça, etc); 2) transplante de fígado ortotópico, uma vez que a TTR é predominantemente sintetizada nesse órgão; 3) Estabilizador do tetrâmero de TTR (tafamidis). Objetiva-se evitar a dissociação da transtirretina em monômeros, e subsequente formação das fibrilas amiloides; e 4) Inotersen. Oligonucleotídeo antisense projetado para suprimir a expressão das formas selvagem e mutada da TTR, aprovado no ano de 2018 pela FDA e EMA. Diferentemente do patisiran que leva à degradação catalítica do RNA mensageiro alvo, o inotersen promove a clivagem desse através de um mecanismo via RNase H1-dependente, que funciona de forma estequiométrica (1 molécula de inotersen : 1 RNA mensageiro alvo clivado) (KRISTEN et al., 2018).

Apesar da introdução desse fármaco inovador no mercado, que é o patisiran, cabe apontar que a tecnologia de *delivery* dos conjugados com o açúcar *N*-acetilgalactosamina trivalente apresenta algumas vantagens frente ao emprego de nanopartículas lipídicas. A formulação com as nanopartículas requer administração frequente do fármaco, a qual é acompanhada por riscos de reações devido à infusão e culmina na necessidade do paciente receber, previamente, esteroides e anti-histamínicos. Em contrapartida, formulações utilizando GalNAc são administradas via subcutânea com intervalos de dose maiores (LAWRENCE, 2018). Por fim, pode-se notar o grande potencial dessa estratégia de *delivery* a partir da quantidade de fármacos em desenvolvimento utilizando-a, abordados no tópico anterior desse trabalho.

4.3 MEDICAMENTOS RNAi: ASPECTOS REGULATÓRIOS

Podem-se inserir os pequenos RNAs interferentes na classe, ainda em evolução, de agentes terapêuticos que são oligonucleotídeos sintéticos, os quais apresentam desafios científicos e regulamentares diferenciados. Além dos pequenos RNAi de cadeia dupla, tais agentes incluem: aptâmeros, ácidos nucleicos simples fita anti-senso, dentre outros (MOHAN, 2019).

Por essa classe abranger moléculas com mecanismos de ação e perfis toxicológicos diversos, sintetizadas com variadas modificações químicas e empregando diferentes sistemas de *delivery* do fármaco, torna-se difícil a elaboração de expectativas regulatórias únicas que devem ser atendidas por todos esses agentes terapêuticos.

Não há diretrizes regulatórias da FDA ou do *International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use* (ICH) que abordem especificamente as expectativas/padrões de qualidade para esses agentes, que são oligonucleotídeos. Por exemplo, se carece de consenso a respeito de identificação de impurezas (MOHAN, 2019). Cabe ressaltar que o ICH é o principal fórum de harmonização de requerimentos técnicos composto por autoridades reguladoras e associações de indústrias

farmacêuticas e que, além disso, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária brasileira (ANVISA) é membro regulador deste desde 2016. Como consequência de sua participação, há um favorecimento no alinhamento da legislação brasileira sobre medicamentos às melhores práticas internacionais (ANVISA, 2016).

Uma vez que os fármacos oligonucleotídeos são fabricados por síntese química orgânica, se assemelham mais aos fármacos sintéticos do que aos biológicos. Assim, de forma geral as agências regulatórias têm aplicado as diretrizes do ICH para fármacos que são pequenas moléculas orgânicas sintéticas também para os oligonucleotídeos, com adaptações em alguns casos. Exemplos de casos aplicáveis são: guias a respeito de estabilidade tanto do produto acabado quanto do insumo farmacêutico ativo, validação de método analítico, especificações, gerenciamento de risco de boas práticas de fabricação, etc (European Biopharmaceutical Review).

Como já abordado anteriormente neste trabalho, patisiran (Onpattro^{TM}) foi o primeiro medicamento cujo princípio ativo é um pequeno RNA interferente de cadeia dupla aprovado no mundo. A empresa *Alnylam Pharmaceuticals, Inc.* concluiu as submissões regulatórias deste medicamento à FDA (especificamente ao Centro de Avaliação e Pesquisa de Medicamentos – CDER - *Center for Drug Evaluation and Research*) e à agência europeia em dezembro de 2017, tendo obtido as aprovações em agosto de 2018 (MORRISON, 2018). A empresa também obteve aprovação do Onpattro^{TM} pela agência japonesa em junho de 2019, após submissão em setembro de 2018. Nos três casos, houve priorização da análise do processo de registro do medicamento por, dentre os motivos, objetivar tratar uma doença considerada rara, carente de opções terapêuticas eficazes (*Alnylam Pharmaceuticals, Inc*).

Recentemente (junho de 2019) a companhia farmacêutica citada também completou o processo de submissão do medicamento givosiran, para o tratamento da porfiria hepática aguda, à FDA e ao EMA. Resultados do estudo de fase III, ENVISION, compõem o processo de registro. Neste estudo randomizado, duplo-cego, controlado por placebo, global e multicêntrico buscava-se avaliar a eficácia e segurança de givosiran em pacientes com diagnóstico documentado de porfiria

hepática aguda. Com 94 pacientes participantes, aqueles que receberam o fármaco testado tiveram uma redução média de 74% na taxa anualizada de ataques que necessitam, por exemplo, de hospitalização, em comparação ao placebo, com um perfil geral aceitável de segurança e tolerabilidade (BALWANI et al., 2019).

5. CONCLUSÃO

O final da década de 90 marcou o início de uma potencial transformação da medicina. A descoberta de que pequenos RNAs interferentes exógenos poderiam, utilizando-se de uma via inerente às células humanas, culminar no silenciamento gênico se mostrou extremamente promissora para o desenvolvimento de terapias inovadoras.

A partir da compreensão da biogênese dos microRNAs, bem como do mecanismo de silenciamento gênico pós-transcricional, do qual esses participam, têm-se o investimento em diversas estratégias para se traduzir a ciência do RNA interferente em fármacos e medicamentos comercialmente viáveis.

Nos anos que se seguiram, observaram-se movimentos das indústrias farmacêuticas com investimentos de milhões de dólares para o desenvolvimento da tecnologia do RNAi. Essa apresentava diversas vantagens potenciais frente às outras estratégias terapêuticas existentes até então. Vislumbrava-se o emprego do mecanismo de silenciamento gênico descoberto em terapias de pacientes acometidos por patologias consideradas anteriormente não tratáveis, muitas delas raras, mas também doenças mais prevalentes como a hemofilia e hipercolesterolemia. Entretanto, a aplicação da tecnologia de interferência por RNA na prática clínica perpassava pela superação de desafios. Potencial resposta imune induzida pela administração do pequeno RNA interferente, rápida degradação deste por ribonucleases e, dentre outros, necessidade de *delivery* eficiente para as células corretas. Diante disso, diversos estudos têm sido realizados resultando, por exemplo, em modificações químicas na estrutura do pequeno RNA interferente, conjugação desse com açúcar *N*-acetilgalactosamina trivalente e associação do ácido nucleico a nanopartículas.

Deve-se dizer, no entanto, que é extremamente animadora a rápida evolução da compreensão do mecanismo de silenciamento gênico por RNA interferente e sua utilização como opção terapêutica inédita para os pacientes. Após aproximadamente 20 anos, hoje existem diversos estudos clínicos com fármacos que são pequenos RNAs interferentes em andamento, bem como um

medicamento (Onpattro^{TM}) já aprovado nos EUA, Europa e Japão e processo de registro de outro, givosiran, em andamento. Sendo assim, é fato que já se alcançou a obtenção de, pelo menos, um medicamento seguro e eficaz cujo princípio ativo é um pequeno RNA interferente, porém ainda será de suma importância o acompanhamento de quaisquer problemas relacionados ao uso desse e de novos medicamentos do mesmo tipo pela farmacovigilância.

À medida que pesquisas de tratamentos baseados em aspectos moleculares das patologias vem crescendo e resultados positivos vem sendo alcançados no desenvolvimento de fármacos RNAi, mais investimentos nessa tecnologia serão observados. Consequentemente, a médio e longo prazo, pode-se esperar mais medicamentos desse tipo no mercado, com variadas indicações pautadas em estudos de diferentes patologias, ampliando a classe dos fármacos RNA interferentes e, inevitavelmente, levando à definição de aspectos regulatórios específicos.

6. BIBLIOGRAFIA

AAGAARD, L; ROSSI, J. J. RNAi Therapeutics: Principles, Prospects and Challenges. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v.59, p.75–86, 2007.

Alnylam Continues Leadership in RNAi Technologies and Delivery with New Pre-Clinical Data Presented on "Enhanced Stabilization Chemistry Plus" (ESC+) GalNAc-siRNA Conjugate Platform at 13th Annual Meeting of the Oligonucleotide Therapeutics Society. Disponível em: http://investors.alnylam.com/news-releases/news-release-details/alnylam-continues-leadership-rnai-technologies-and-delivery-new. Acesso em: 21 Jun. 2019.

Alnylam Pharmaceuticals, Inc. Alnylam Announces Approval in Japan of ONPATTRO® for the Treatment of Hereditary ATTR Amyloidosis with Polyneuropathy. Disponível em: http://investors.alnylam.com/news-releases/news-release-details/alnylam-announces-approval-japan-onpattror-treatment-hereditary. Acesso em: 21 jun. 2019.

Alnylam Pharmaceuticals, Inc. Alnylam receives approval of ONPATTRO™ (patisiran) in Europe. Disponível em: http://investors.alnylam.com/news-releases/news-release-details/alnylam-receives-approval-onpattrotm-patisiran-europe. Acesso em: 21 jun. 2019.

Alnylam Pharmaceuticals, Inc. THE SCIENCE OF RNAi. Disponível em: https://www.alnylam.com/our-science/the-science-of-rnai/. Acesso em: 30 jun. 2019.

Alnylam Submits Marketing Authorization Application to the European Medicines Agency for Givosiran for the Treatment of Acute Hepatic Porphyria. Disponível em: http://investors.alnylam.com/news-releases/news-release-details/alnylam-submits-marketing-authorization-application-european. Acesso em: 20 jul. 2019.

Anvisa é novo membro do ICH. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=3080115&_101_type=content&_101_groupId=219201&_101_urlTitle=com-o-inicio-da-reforma-do-ich-a&inheritRedirect=true. Acesso em: 07 jul. 2019.

BALWANI, M. et al. GS-14-ENVISION, a phase 3 study to evaluate efficacy and safety of givosiran, na investigational RNAi therapeutic targeting aminolevulinic acid synthase 1, in acute hepatic porphyria patients. *Journal of Hepatology*, v.70, 2019.

BENDER, Eric. The second coming of RNAi. Disponível em: https://www.the-scientist.com/features/the-second-coming-of-rnai-36936. Acesso em: 05 mar. 2019.

CHEN, X. et al. RNA interference-based therapy and its delivery systems. *Cancer and Metastasis Reviews*, v.37, p.107–124, 2018.

DANA, H. et al. Molecular Mechanisms and Biological Functions of siRNA. *International Journal of Biomedical Science,* v.13, p.48-57, 2017.

DAS, M.; MUSETTI, S.; HUANG, L. RNA interference-based cancer drugs: the roadblocks, and the ‘‘delivery’’ of the promise. *Nucleic Acid Therapeutics*, v.29, 2018.

DONG, Y. et al. A dual targeting dendrimer-mediated siRNA delivery system for effective gene silencing in cancer therapy. *Journal of the American Chemical Society*, v.140, p.16264−16274, 2018.

DRAZ, M. S. et al. Nanoparticle-Mediated Systemic Delivery of siRNA for Treatment of Cancers and Viral Infections. *Theranostics,* v.4, p. 872-892, 2014.

European Biopharmaceutical Review. Regulatory Challenges. Disponível em: http://www.samedanltd.com/?mod=magazine&id=12&page=article&issid=169&pid=3212&post. Acesso em: 20 jul. 2019.

FIRE, A. et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, v.391, p.806-811, 1998.

FRANÇA, N.R. et al. Interferência por RNA: uma nova alternativa para terapia nas doenças reumáticas. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v.50, p.695-709, 2010.

HUANG, Y. Preclinical and Clinical Advances of GalNAc-Decorated Nucleic Acid Therapeutics. *Molecular Therapy: Nucleic Acids,* v.6, p.116-132, 2017.

HUYNH, A; MADU, C. O; LU, Y. siRNA: A Promising New Tool for Future Breast Cancer Therapy. *Oncomedicine*, v.3, p.74-81, 2018.

JANAS, M. M et al. Safety evaluation of 2-deoxy-2-fluoro nucleotides in GalNAc-siRNA conjugates. *Nucleic Acids Research*, v.47, p.3306–3320, 2019.

JANAS, M. M. et al. Selection of GalNAc-conjugated siRNAs with limited off-target driven rat hepatotoxicity. *Nature Communications*, v.9, 2018.

JANAS, M. M. et al. The Nonclinical Safety Profile of GalNAc-conjugated RNAi Therapeutics in Subacute Studies. *Toxicologic Pathology,* v.46, p.735-745, 2018.

JAYARAMAN, M. et al. Maximizing the Potency of siRNA Lipid Nanoparticles for Hepatic Gene Silencing In Vivo. *Angewandte Chemie International Edition,* v.51, p. 8529 –8533, 2012.

Karolinska Institutet. The nobel prize in physiology or medicine 2006. Disponível em: <https://www.nobelprize.org/prizes/medicine/2006/advanced-information/>. Acesso em: 27 dez. 2018.

KIM, Y.-K; KIM, B; KIM, V. N. Re-evaluation of the roles of DROSHA, exportin 5, and DICER in microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.113, p.1881-1889, 2016.

KRISTEN, A. V. et al. Patisiran, an RNAi therapeutic for the treatment of hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Neurodegenerative Disease Management*, v.9, p.5-23, 2018.

LAWRENCE, J. RNA interference therapies could be on the cusp of success. *The Pharmaceutical Journal*, 2018.

LIEBERMAN, J. Tapping the RNA world for therapeutics. *Nature Structural & Molecular Biology*, v. 25, p.357–364, 2018.

MOHAN, S. CMC Regulatory Considerations for Oligonucleotide Drug Products: FDA Perspective. Disponível em: http://pqri.org/wp-content/uploads/2017/02/3-SapruPQRI-FDA-Conference-Oligo-2017-Presentation.pdf. Acesso em: 07 jul. 2019.

MONTGOMERY, M.K; XU, S; FIRE, A. RNA as target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v.95, p.15502-15507, 1998.

MOORE, C. B. et al. Short Hairpin RNA (shRNA): Design, Delivery, and Assessment of Gene Knockdown. *Methods in Molecular Biology*, v.629, p.141–158, 2010.

MORRISON, C. Alnylam prepares to land first RNAi drug approval. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.17, p.156-157, 2018.

NDA 210922 – Patisiran – Cross-Discipline Team Leader Review. Disponível em: https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2018/210922Orig1s000MultiR.pdf . Acesso em: 29 jul. 2019.

PECOT, C. V. et al. RNA interference in the clinic: challenges and future directions. *Nature Reviews Cancer*, v.11, p.59–67, 2011.

RxList. Onpattro. Disponível em: https://www.rxlist.com/onpattro-drug.htm#description. Acesso em: 07 jul. 2019.

SHEN, X; COREY, D. R. Chemistry, mechanism and clinical status of antisense oligonucleotides and duplex RNAs. *Nucleic Acids Research*, v.46, p.1584–1600, 2018.

SPRINGER, A.D.; DOWDY, S.F. GalNAc-siRNA conjugates: leading the way for delivery of RNAi therapeutics. *Nucleic Acid Therapeutics*, v.28, p.109-118, 2018.

TAM, Y.Y.C; CHEN S; CULLIS P. R. Advances in Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery. *Pharmaceutics*, v.5, p.498-507, 2013.

TATIPARTI, K. et al. siRNA Delivery Strategies: A Comprehensive Review of Recent Developments. *Nanomaterials*, v.7, 2017.

TIEMANN, K; ROSSI, J. J. RNAi-based therapeutics–current status, challenges and prospects. *EMBO Molecular Medicine*, v.1, p.142–151, 2009.

VIGER-GRAVEL, J. et al. Structure of Lipid Nanoparticles Containing siRNA or mRNA by Dynamic Nuclear Polarization Enhanced NMR Spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, v.122, p.2073−2081, 2018.

YU, A.-M. et al. RNA therapy: are we using the right molecules?. *Pharmacology & Therapeutics*, v.196, p.91-104, 2019.

ZHOU, Y; ZHANG, C; LIANG, W. Development of RNAi technology for targeted therapy — a track of siRNA based agents to RNAi therapeutics. *Journal of Controlled Release*, v.193, p.270–281, 2014.

04/09/19

Data e assinatura do aluno(a)

04/09/19

Data e assinatura do orientador(a)

Scanned by CamScanner