

(19)



**Евразийское  
патентное  
ведомство**

(11) **037448**(13) **B1**

**(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ**

**(45)** Дата публикации и выдачи патента  
**2021.03.30**

**(21)** Номер заявки  
**201401337**

**(22)** Дата подачи заявки  
**2013.06.07**

**(51)** Int. Cl. *A61K 47/48* (2006.01)  
*C12N 15/11* (2006.01)  
*C12N 15/67* (2006.01)

---

---

**(54) СПОСОБ ДОСТАВКИ В ЛЕГКИЕ ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЙ МРНК С РЕИ И  
ФАРМАЦЕВТИЧЕСКАЯ КОМПОЗИЦИЯ**

---

**(31)** 61/657,344

**(32)** 2012.06.08

**(33)** US

**(43)** 2015.05.29

**(86)** PCT/EP2013/061811

**(87)** WO 2013/182683 2013.12.12

**(71)(73)** Заявитель и патентовладелец:  
ЭТРИС ГМБХ (DE)

**(72)** Изобретатель:  
Гайгер Йоханнес, Анеджа Маниш  
Кумар, Рудольф Карстен (DE)

**(74)** Представитель:  
Бадаева Т.Н., Фелицына С.Б. (RU)

**(56)** WO-A1-2010037408

US-A1-20090299127

US-A1-20110229528

TATJANA C. GUST ET AL.: "RNA-containing adenovirus/polyethylenimine transfer complexes effectively transduce dendritic cells and induce antigen-specific T cell responses", THE JOURNAL OF GENE MEDICINE, vol. 6, no. 4, 1 April 2004 (2004-04-01), pages 464-470, XP055079370, ISSN: 1099-498X, DOI: 10.1002/jgm.492, the whole document

WO-A1-2009127230

WO-A1-2010037408

EP-A1-2338520

WO-A2-0200870

**(57)** Изобретение относится к способу доставки в легкие полиплекса терапевтической мРНК и РЕИ, а также к применению заявленного способа для лечения дефекта легких. Также изобретение относится к фармацевтической композиции, содержащей полиплекс терапевтической мРНК и РЕИ. В частных случаях указанный полиплекс может быть в виде аэрозоля, содержащего магнитные частицы, которые осаждают магнитным полем на поверхность легких.

**B1****037448****037448****B1**

Настоящее изобретение относится к способу экспрессии мРНК в легких.

Матричные РНК (мРНК) представляют собой полимеры, которые собираются из нуклеозидфосфатных составляющих блоков, главным образом, из аденозина, цитидина, уридина и гуанозина как нуклеозидов, которые, как промежуточные носители, несут генетическую информацию из ДНК, находящейся в ядре клетки, в цитоплазму, где она транслируется в белки. Таким образом, они подходят в качестве альтернативы для экспрессии генов.

Выяснение биохимических процессов в клетке и расшифровка генома человека обнаружили связи между дефицитными генами и болезнями. Поэтому давно существует потребность лечить болезни вызванные дефектными генами генной терапией. Ожидания были большими, но первые попытки в этой области потерпели неудачу, и только недавно поступили сообщения о прогрессе. Первый подход к генной терапии состоял во введении интактной ДНК дефицитного или дефектного гена в составе вектора в ядро клетки для того, чтобы получить экспрессию интактного гена и, таким образом, восполнить недостаток дефектного или отсутствующего белка. Такие попытки по большей части были безуспешными, и менее успешные попытки сопровождались существенным побочным действием, в частности повышенным онкогенезом. Только совсем недавно появились сообщения о более обещающих результатах, которые однако еще далеки от признания.

Кроме того, существуют заболевания, которые происходят из-за недостатка белков или белкового дефекта, которые, однако, не возникли вследствие генетического дефекта. В этих случаях также рассматривают получение релевантных белков *in vivo* путем введения ДНК. Обеспечение факторами, которые участвуют в метаболизме и разрушены или ингибированы по патологическим или непатологическим причинам, также может быть осуществлено путем нуклеотидной терапии с нулевым или слабым побочным действием.

Также уже предложено использовать мРНК для терапии наследственных болезней для того, чтобы лечить дефекты генов, которые ведут к болезням. Преимущество состоит в том, что мРНК необходимо только ввести в цитоплазму клетки, а не транслоцировать в ядро. Транслокация в ядро является трудной и неэффективной; более того имеется существенная опасность изменения хромосомной ДНК, если вектор или его части включаются в геном.

Конечно, можно показать, что *in vitro* транскрибированная матричная ДНК действительно может экспрессироваться в ткани млекопитающего, однако появляются другие препятствия при попытке использовать мРНК для терапии заболеваний. Отсутствие устойчивости у мРНК ведет к тому, что нужный белок невозможно сделать доступным в достаточном количестве в ткани млекопитающего. Другой существенный недостаток является результатом того факта, что мРНК запускает важные иммунологические реакции. Предполагается, что такие сильные иммунные реакции возникают из связывания с toll-подобными рецепторами, такими как TLR3, TLR7, TLR8 и геликазой RIG-1.

Для того чтобы предотвратить иммунологическую реакцию, в WO 2007/024708 А предлагается использовать РНК, в которой один из четырех рибонуклеотидов заменен модифицированным нуклеотидом. В частности, исследуется, как ведет себя мРНК, когда уридин полностью заменен псевдоуридином. Обнаружено, что такая молекула РНК является значительно менее иммуногенной. Кроме того, также предлагается использовать РНК с последовательностью, которая кодирует белок или фрагмент белка, при этом РНК содержит комбинацию немодифицированных и модифицированных нуклеотидов, при этом 5-50% уридиновых нуклеотидов и 5-50% цитидиновых нуклеотидов являются соответственно модифицированными уридиновыми нуклеотидами и модифицированными цитидиновыми нуклеотидами. Обнаружено, что такая молекула РНК значительно менее иммуногенна и даже более устойчива. Также предполагается, что такую РНК можно использовать для предотвращения гибели мышей, страдающих от недостатка сурфактантного белка В (SP-B), путем многократного применения интратрахеального аэрозоля у мышей. Таким образом, эти наблюдения показывают перспективность использования такой РНК для лечения угрожающих жизни наследственных и приобретенных болезней легких и решает имеющуюся давно существующую лечебную потребность. Однако, что касается применения у пациентов, то эта процедура пока не подходит для многократного применения аэрозоля из-за необходимой анестезии и разрушения РНК при использовании стандартных небулайзеров, используемых клинически.

Для того, чтобы обеспечить легкие организма необходимыми или полезными белками и/или лечить заболевание, вызванное отсутствием или недостатком белков с помощью РНК, желательно иметь доступный способ многократного применения аэрозоля, который позволит избежать повторной анестезии пациента. Однако такой способ в то же время не должен вызывать снижения эффективности РНК в значительной степени.

В EP 1173224 B1 предлагается использовать композиции полиэтиленимин (PEI) в 25 кД/ДНК для аэрозольной доставки генов в легкие, что подходит для преодоления ранее нерешенной проблемы повторной анестезии и заметного снижения эффективности, которая сопровождает процесс распыления по сравнению с трансфекцией *in vitro*. Обнаружено, что композиции PEI/ДНК устойчивы к вызываемому струйным небулайзером снижению эффективности трансфекции и превосходны для оптимизированных ранее композиций на основе липидов при доставке *in vivo* с помощью струйного небулайзера. В EP 1173224 B1 раскрывается способ направленной терапии, такой как генная терапия, через дыхательные

пути, включающий стадию доставки водных дисперсий генетической макромолекулы в комплексе с полиэтиленимином в небольших аэрозольных частицах через дыхательные пути индивидуума. Характерные примеры генетических макромолекул согласно способам изобретения включают ДНК, РНК и другие виды нуклеиновых кислот. Однако в примерах, включенных в патент, изобретение доводится до практического осуществления только для доставки ДНК, но не мРНК. Кроме того, комплексы кодирующей представляющий интерес ген плазмидной ДНК с PEI образованы путем смешивания плазмидной ДНК, растворенной в воде, с соответствующими количествами PEI, растворенного в PBS. Однако Rudolf et al. (Mol. Ther. 2005, 12: 493-501) показали, что комплексы PEI-ДНК, когда собираются и распыляются в гипосмотической дистиллированной воде, дают в 57 и 185 крат более высокие уровни экспрессии в легких мышей, чем комплексы в изотоничной 5% глюкозе или забуференном Нерес физиологическом растворе, соответственно. Неожиданно комплексы PEI-ДНК, когда собирались и распылялись в PBS, были совершенно неэффективны. Это главным образом объясняют тем фактом, что PEI-генные векторы, включенные в PBS, получают больших диаметров ( $848 \pm 142$  нм) и кинетически неустойчивы, что ведет к преципитации. Также обнаружено, что включенная в аэрозоль пДНК в количествах в нанограммах (350 нг) в комплексе с PEI дает уровни трансфекции в 15 крат более высокие, чем 140-кратная более высокая доза (50 мкг) того же вектора, внесенного непосредственно в легкие мышей с помощью интратрахеальной интубации.

Кроме того, Bettinger et al. (Nucleic Acids Res., 2001, 29: 3882-91) показали, что липоплексы, но не полиплексы, на основе полиэтиленимина (разветвленный PEI в 25 и линейный PEI в 22 кД), поли(L-лизина) (PLL, 54 кД) или дендримеров опосредуют эффективную трансляцию мРНК в трансфицированных клетках B16-F10. Отсутствие экспрессии с PEI в 25 кД/мРНК или PLL в 54 кД/мРНК в бесклеточном анализе трансляции и последующей инъекции в клетки Rat1 показывают, что такие полиплексы слишком устойчивы для высвобождения мРНК. Показано, что сила электростатического взаимодействия между мРНК и агентом трансфекции имеет серьезное влияние на достигаемый уровень экспрессии с термодинамически устойчивыми полиплексными векторами, например, PEI-мРНК, являясь менее подходящими для трансляции мРНК. Снижение электростатического взаимодействия между носителем с мРНК за счет использования более коротких поликатионов дает значительное возрастание экспрессии, причем полиплексы мРНК, образованные с использованием низкомолекулярных PEI и PLL, достигают в 5 раз большие уровни экспрессии люциферазы, чем DOTAP/мРНК. Однако полиплексы, образованные с использованием низкомолекулярных поликатионов, утрачивают их эндосомолитическую активность и требуют хлорохина для того, чтобы опосредовать экспрессию мРНК. Эндосомолиз восстанавливается путем конъюгации низкомолекулярного PEI с мембраноактивным пептидом мелиттином, и высокие уровни экспрессии мРНК показаны в отсутствие хлорохина. Вместе такие наблюдения показывают, что связывание одноцепочечной мРНК с катионным полимером значительно сильнее, чем связывание пДНК. Это также подтвердили Nuth et al. (J. Gene Med., 2006, 8: 1416-1424), которые предположили, что цитозольная РНК вовлекается в высвобождение пДНК из катионных полимеров как предварительное условие проникновения в ядро, транскрипции и успешной экспрессии трансгена. В итоге такие наблюдения привели к мысли, что PEI в 25 кД неспособен опосредовать доставку функциональной мРНК в клетки.

Так как постоянное многократное лечение, включая интубацию, несовместимо с требованиями качества жизни, задачей, лежащей в основе настоящего изобретения, было предложить пластичный и неинвазивный способ ингаляционной доставки матричной РНК, приводящий к экспрессии в легких белка, кодированного указанной мРНК.

Уровень техники испытывает недостаток в неинвазивных способах ингаляционной доставки мРНК.

Поэтому целью настоящего изобретения является способ доставки терапевтической мРНК посредством неинвазивного ингаляционного введения, что приводит к продуцированию в легких кодированного белка на эффективных уровнях.

Следовательно, настоящее изобретение относится к способу доставки терапевтической мРНК в легкие для продукции белка, кодируемого указанным терапевтической мРНК, на эффективном уровне в клетках легких, причем указанный способ включает неинвазивное ингаляционное введение полиплекса мРНК и полиэтиленимина (PEI), предоставленного в форме, подходящей для усвоения через легкие, посредством чего указанный полиплекс проникает в клетки легких, и указанная мРНК экспрессируется в клетках легких, где PEI имеет молекулярную массу от 1 до 1000 кД.

PEI, вводимый по ходу настоящего изобретения, обычно не является критичным (Morimoto et al., Mol. Ther. 7 (2003), 254-261).

Предпочтительно PEI имеет молекулярную массу от 10 до 50 кД, в частности от 20 до 30 кД.

Предпочтительно мРНК кодирует муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости (CFTR), сурфактантный белок В (SPB), член 3 подсемейства А АТФ-связывающей кассеты (ABCA3), альфа-1-антитрипсин (A1AT), сурфактантный белок С (SPC), эритропоэтин, фактор VIII, фактор IX, фактор фон Виллебранда, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ADAMTS 13, гепцидин, ангиотензинпревращающий фермент II или антигены вирусных и бактериальных патогенов.

Предпочтительно полиплекс мРНК и PEI, вводят в легкие интратрахеально, предпочтительно, в виде аэрозоля, в частности, распылением при высоком давлении.

Предпочтительно аэрозоль содержит магнитные частицы, в частности, магнитные частицы диаметром от 5 и до 800 нм.

Предпочтительно PEI дополнительно соединен с магнитными частицами.

Предпочтительно аэрозоль, содержащий магнитные частицы, осаждает магнитным полем на поверхность легких, подлежащих лечению.

Предпочтительно магнитное поле имеет напряженность по меньшей мере 100 мТл (миллitesла), по меньшей мере 200 мТл, по меньшей мере 500 мТл или по меньшей мере 1 Тл (тесла).

Более предпочтительно магнитное поле имеет градиент магнитного поля, превышающий 1 Т/м или превышающий 10 Т/м.

Предпочтительно магнитное поле представляет собой пульсирующее, переменное или пульсирующее переменное магнитное поле.

Предпочтительно магнитное поле динамически соответствует дыханию пациента и активно только во время пауз отдыха между вдыханием и выдыханием или выдыханием и вдыханием (EP 1924244A).

Настоящее изобретение также относится к применению описанного выше способа для лечения дефекта легких, вызванного геном, который имеет патогенное действие в легких для пациента.

Предпочтительно пациентом является человек, а дефект легких выбран из недостаточности сурфактантного белка В (SPB), недостаточности члена 3 подсемейства А АТФ-связывающей кассеты (ABCA3), муковисцидоза, недостаточности альфа-1-антитрипсина (A1AT), рака легких, недостаточности сурфактантного белка С (SPC), альвеолярного протеиноза, саркоидоза, острого и хронического бронхита, эмфиземы, синдрома Маклеода, хронической обструктивной болезни легких (COPD), бронхиальной астмы, бронхоэктаза, пневмокониоза, асбестоза, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), респираторного дистресс-синдрома у детей (IRDS), отека легких, легочной эозинофилии, пневмонии Леффлера, синдрома Хаммена-Рича, идиопатического легочного фиброза, интерстициальных заболеваний легких, первичной цилиарной дискинезии, легочной артериальной гипертензии (ПАН) и недостаточности STAT5b, дефектов свертывания крови, в частности гемофилии А и В; дефектов комплемента, в частности недостаточности белка С, тромбоцитопенической тромбогемолитической пурпуры и врожденного гемохроматоза, в частности недостаточности гепцидина; легочных инфекционных заболеваний, предпочтительно респираторно-синцитиальной вирусной инфекции (RSV), парагриппозной вирусной инфекции (PIV), гриппозной вирусной инфекции, риновирусной инфекции и тяжелого острого респираторного синдрома (коронавирусной (SARS-CoV) инфекции), туберкулеза, синегнойной инфекции, инфекции *Burkholderia cepacia*, метициллин-резистентной золотистостифилококковой инфекции (MRSA) и инфекции *Haemophilus influenzae*.

Настоящее изобретение также относится к фармацевтической композиции для доставки терапевтической мРНК в легкие для продукции белка, кодируемой указанной терапевтической мРНК, на эффективном уровне в клетках легких, причем указанная фармацевтическая композиция содержит полиплекс указанной мРНК и PEI, где мРНК способна экспрессировать указанный кодируемый белок в клетках легких, и PEI имеет молекулярную массу 1-1000 кД, где композиция обеспечивается в форме, подходящей для усвоения через легкие.

В случае фармацевтической композиции по изобретению также предпочтительно, чтобы PEI был дополнительно соединен с магнитными частицами, имел молекулярную массу от 10 до 50 кД, в особенности от 20 до 30 кД.

В определенных воплощениях фармацевтическая композиция по изобретению состоит из:

(i) указанных мРНК и PEI;

(ii) указанных мРНК и PEI и

(A) дистиллированной воды

(B) фармацевтически приемлемой воды/воды для инъекции (WFI);

(C) автоклавированной воды высшей степени очистки или

(D) водопроводной воды; или

(iii) (i) или (ii) и (a) фармацевтически приемлемого носителя (носителей) и/или (a) дополнительных вспомогательных соединений.

Предпочтительно мРНК, используемая в фармацевтической композиции, кодирует муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости (CFTR), сурфактантный белок В (SPB), член 3 подсемейства А АТФ-связывающей кассеты (ABCA3), альфа-1-антитрипсин (A1AT), сурфактантный белок С (SPC), эритропоэтин, фактор VIII, фактор IX, фактор фон Виллебранда, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ADAMTS 13, гепцидин, ангиотензинпревращающий фермент II или антигены вирусных и бактериальных патогенов.

Лечение аэрозолями с перфторуглеродами обычно показывает улучшенный газообмен и уменьшенную воспалительную реакцию в легких, в зависимости от молекулярной структуры и давления паров перфторуглеродов. Хотя различия в давлении паров и молекулярной структуре могут приводить к изменению стратегий оптимального дозирования, показано, что некоторые различные перфторуглероды преимущественно подходят для лечения аэрозолями, например перфторированный простой циклоэфир (FC77), перфтороктилбромид или перфтортрибутилам (FC43).

Соответственно настоящее изобретение предпочтительно относится к фармацевтической композиции, которая дополнительно включает по меньшей мере один фторуглерод, где указанный фторуглерод включает перфторуглероды, подходящие для использования при лечении аэрозолями, причем особо предпочтительно, когда эта композиция выполнена в форме аэрозоля.

Такой аэрозоль предпочтительно содержит магнитные частицы, в частности магнитные частицы диаметром от 5 и до 800 нм (EP 1924244A).

Более предпочтительно аэрозоль содержит магнитные частицы, которые имеют диаметр от 50 и до 750 нм, предпочтительно от 100 и до 700 нм, предпочтительнее от 150 и до 600 нм, еще предпочтительнее от 200 и до 500 нм, особенно предпочтительно от 250 и до 450 нм, наиболее предпочтительно от 300 и от 400 нм.

Предпочтительно магнитные частицы состоят из металлов и/или их оксидов и/или гидроксидов, или содержат металлы и/или их оксиды и/или гидроксиды.

Причем предпочтительно металлы выбирают из железа, кобальта или никеля; и оксиды или гидроксиды выбирают из  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , двойных оксидов или гидроксидов двух- или трехвалентных ионов железа с  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$  или  $\text{Sm}^{3+}$  и их любых смесей.

Легкие больного человека могут служить в качестве биореактора для секреции из клеток легких в кровотоки белков, экспрессированных мРНК, таких как эритропоэтин, для восполнения дефектов свертывания крови, таких как гемофилия А и В, дефектов комплемента, таких как недостаточность белка С, тромбоцитопенической тромбогемолитической пурпурой (ТТП, недостаточности ADAMTS 13) и врожденного гемохроматоза (например, недостаточности гепсидина).

Когда экспрессию мРНК из клеток легких используют для вакцинации против легочных инфекционных заболеваний, таких как респираторно-синцитиальная вирусная инфекция (RSV), парагриппозная вирусная инфекция (PIV), гриппозная вирусная инфекция, риновирусная инфекция и тяжелый острый респираторный синдром (коронавирусная (SARS-CoV) инфекция), туберкулез, синегнойная инфекция, инфекция *Burkholderia cenocepacia*, метициллин-резистентная золотистостифилококковая инфекция (MRSA) и инфекция *Haemophilus influenza*, доставляемая мРНК кодирует один или несколько антигенов патогена.

Согласно предпочтительному воплощению настоящего изобретения PEI включает нацеливающий лиганд, предпочтительно лиганд рецептора  $\text{IP}_1$ , предпочтительнее аналог простаглицина, в частности илопрост (5-{(E)-(1S,5S,6R,7R)-7-гидрокси-6-{(E)-(3S,4RS)-3-гидрокси-4-метил-1-октен-6-инил}бицикло[3.3.0]октан-3-илиден}пентановая кислота) или трепростинил ((1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-гексагидро-2-гидрокси-1-{(3S)-3-гидроксиоктил]-1H-бенз[*f*]инден-5-ил]окси]уксусная кислота); или лиганды  $\beta_2$ -адренорецептора, в частности кленбутерол (Elfinger et al., J. Control. Release, 2009, 135: 234-241), лактоферрин (Elfinger et al., Biomaterials, 2007, 28: 3448-3445), уроновые кислоты (Weiss et al., Biomaterials, 2006, 27: 2302-2312) или лектины (Bies et al., Adv. Drug Deliv. Rev., 2004, 56: 425-435).

Использование лиганда рецептора  $\text{IP}_1$ , предпочтительнее аналога простаглицина, для мишень-специфической доставки фармацевтической композиции на основе PEI в клетки легких, в особенности в бронхальные или альвеолярные эпителиальные клетки, раскрыто и доступно из WO 2011/076391 A.

С помощью способа по настоящему изобретению предпочтительно доставлять в клетки легких мРНК, которая оказывает лечебную пользу, в особенности мРНК, которая замедляет, перенастраивает, противодействует или подавляет ген, который имеет патогенное действие в легких или для данного пациента. Конкретно предпочтительно доставлять мРНК, которая замещает дефектный ген в клетке легкого. Соответственно, предпочтительными воплощениями настоящего изобретения являются способы и композиции, в которых мРНК кодирует мусковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости (CFTR), сурфактантный белок В (SPB), член 3 подсемейства А АТФ-связывающей кассеты (ABCA3) или альфа-1-антитрипсин (A1AT), сурфактантный белок С (SPC), гранулоцитарно-макрофагальный колоние-стимулирующий фактор, эритропоэтин, фактор VIII, фактор IX, фактор фон Виллебранда, ADAMTS 13, гепсидин, ангиотензинпревращающий фермент II или антигены вирусных и бактериальных патогенов.

В предпочтительном воплощении комбинация мРНК/PEI по изобретению обеспечивается в форме, подходящей для поглощения через легкие, например, путем ингаляции. Подходящие для этого составы известны специалистам в данной области техники. В таком случае препарат находится в форме, которую можно вводить в дыхательные пути с помощью обычных небулайзеров или ингаляторов, например в жидкой форме для распыления или в виде порошка. Устройства для введения в виде жидкости известны, и подходящими являются ультразвуковые небулайзеры или небулайзеры с перфорированной вибрирующей мембраной, которые работают с низкими сдвиговыми усилиями по сравнению с небулайзерами со струйным распылителем. Также подходящими являются порошковые аэрозоли. Комплекс мРНК с PEI доступен после сушки вымораживанием с сахаром сахарозой в виде порошка, который затем можно измельчить до частиц такого размера, что их можно вдыхать, и кроме того, комплекс показывает биологическую активность.

Особенно подходящим является PEI в 25 кД, который используют для композиции с мРНК, кодирующей белок или фрагмент белка, и при этом композицию получают в дистиллированной воде и применяют к легким в виде аэрозоля с использованием струйного небулайзера.

Особенно предпочтительные воплощения настоящего изобретения получают с использованием

водных буферных растворов и растворителей с низким pH и низкой проводимостью. Буфер PBS имеет pH 7,4 и проводимость  $16500 \pm 500$  мкСм/см (при 25°C). Неожиданно мРНК в композициях по настоящему изобретению показывают повышенную устойчивость, если применяют растворы с более низкой проводимостью и/или меньшим pH. Например, стерилизованная в автоклаве вода высшей степени очистки имеет проводимость  $1 \pm 0,2$  мкСм/см (Фармакопея США требует верхнего предела проводимости при 25°C 1,3) и pH 5,0-7,0. Водопроводная вода, профильтрованная через фильтр 0,2 мкм, имеет проводимость  $300 \pm 5$  мкСм/см. В предпочтительных воплощениях настоящего изобретения применяют водные буферы и растворители с меньшим pH и меньшей проводимостью, чем у буфера PBS. Поэтому фармацевтическая композиция по настоящему изобретению предпочтительно имеет pH ниже 6,5, предпочтительно 3-6, в частности 4-5,5, и/или 25°C-проводимость (т.е. проводимость при 25°C) 10000 мкСм/см или ниже, предпочтительно 1000 или ниже, в частности 100 или ниже. Например, особенно предпочтительное воплощение содержит фармацевтически приемлемую воду (вода для инъекций), определенную в Фармакопее США (вместо буфера, такого как PBS).

Конечно, фармацевтический препарат по настоящему изобретению также может содержать фармацевтически приемлемые носители и/или другие вспомогательные соединения, в особенности соединения, обычно применяемые в аэрозольных композициях для доставки в легкие человека.

Наиболее успешно в области генной терапии используются вирусы с недостаточной репликацией из-за их высокой эффективности трансфекции. Однако опасность инсерционного мутагенеза и индукции нежелательных иммунных реакций все еще остается критической для их безопасного применения. С другой стороны, как безопасная альтернатива для доставки плазмидной ДНК (пДНК) интенсивно исследуются невирусные векторы, хотя их эффективность переноса генов пока во много раз ниже, чем вирусных векторов, что связано преимущественно с недостаточным переносом пРНК в ядро. Вместо пРНК недавно появилась матричная РНК (мРНК) как привлекательная и перспективная альтернатива в области невирусной доставки генов. Такая стратегия объединяет несколько преимуществ по сравнению с пДНК: i) можно обойти ядерную мембрану, так как мРНК осуществляет свою функцию в цитоплазме; ii) можно исключить опасность инсерционного мутагенеза; iii) можно опустить определение и применение эффективного промотора; iv) возможно многократное применение; v) мРНК также эффективна в неделящихся клетках и vi) можно избежать вызываемой вектором иммуногенности.

Среды для переноса генов на основе мРНК появились как привлекательные альтернативы средствам на основе ДНК, для возможного лечения генетических расстройств или (противоопухолевой) вакцинации. Их успешное применение показано в противораковой иммунотерапии не только из-за возможности доставки всех эпитопов чистых антигенов вместе в одну стадию, но манипуляции с ними, а также очистка, также являются весьма простыми. Кроме того, такая стратегия имеет ряд преимуществ в смысле фармацевтической безопасности, поскольку мРНК не интегрируется в геном и трансфекция остается временной. Кодированная неустойчивые антигены мРНК в комбинации с доставкой в дендритные клетки (DC) является сильным и перспективным подходом для вызывания иммунной реакции у больных раком.

До сих пор плазмидную ДНК (пДНК) широко используют для невирусного переноса генов. Однако едва ли можно трансфицировать неделящиеся клетки млекопитающих, и вдобавок неметилированные мотивы CpG бактериальной ДНК вызывают сильную иммунную реакцию через Toll-подобный рецептор 9 (TLR9). Например, только 1-10% DC трансфицируются с помощью электропорации, катионных полимеров или катионных липидов. С другой стороны, ранее показано, что эффективность трансфекции электропорацией мРНК достигает 95% трансфицируемых клеток. Такие наблюдения предполагают, что перенос мРНК значительно более эффективен по сравнению с переносом пДНК, по большей части, из-за того, что мРНК не должна переноситься в ядро. Поэтому сообщается о ранней и существенно более высокой экспрессии белка.

Хотя перечисленные выше преимущества использования мРНК для невирусного переноса генов следует подчеркнуть, необходимо отметить, что мРНК в эукариотных клетках претерпевает приблизительно 13 различных нуклеозидных модификаций, включая метилирование, и транскрибированная *in vitro* мРНК вызывает сильные иммунные реакции, опосредуемые TLR3, TLR7 и TLR8, что представляет основную проблему для ее успешного применения *in vivo*. Однако модифицированные нуклеозиды могут вносить вклад в снижение таких иммунных раздражающих действий, что будет обсуждаться позднее.

Зрелая мРНК в эукариотических клетках состоит из пяти значимых частей: кэповой структуры (m7Gp3N (N: любой нуклеотид), 5'-нетранслируемого участка (5' UTR), открытой рамки считывания (ORF), 3'-нетранслируемого участка (3' UTR) и хвоста в 100-250 аденозиновых остатков (хвост поли(A)). Транскрибированная *in vitro* мРНК может быть получена из плазмидной ДНК, включающей бактериофаговый промотор, такой как T7, SP6 или T3. Транскрипция *in vitro* является обычным методом с использованием коммерчески доступных наборов для получения достаточных количеств функциональной мРНК. До сих пор осуществимость и техническая доработка постоянно улучшаются.

Обнаружено, что от одной трети до половины кэпов во время транскрипции *in vitro* вводятся в обратную ориентацию, что делает их неузнаваемыми для кэпсвязывающего белка эукариотного фактора инициации 4E (eIF4E). Вместо нормальной кэповой структуры находят, что антиреверсный кэповый ана-

лог (ARCA),  $m_2^{7,3^{18}O}$ Gp3G и  $m_2^{7,3^{18}O}$ dGp3G, в котором группа 3'ОН нормального кэпа удалена или заменена на  $OCH_3$ , может избегать включения кэпа в неправильной ориентации. Как следствие, сообщается о большем числе модификаций ARC A. Представляет интерес, что обнаружено, что модификации не только в позиции C3', но также в позиции C2' предотвращают обратное включение. Кроме того, тетрафосфатные ARCA могут промотировать трансляцию более эффективно, чем другие кэповые аналоги. В результате ARCA-кэпированные *in vitro* транскрипты (ARCA-мРНК) в лизате кроличьих ретикулоцитов показывают значительно большую эффективность трансляции по сравнению с нормальными кэпированными транскриптами (CAP-мРНК). Далее сообщается, что обнаружено, что  $m_2^{7,3^{18}O}$ Gpp<sub>CH2</sub>pG или  $m_2^{7,3^{18}O}$ Gp<sub>CH2</sub>ppG, в которых образующий мостик кислород в  $\alpha$ - $\beta$ -связи или  $\beta$ - $\gamma$ -связи заменен метиленовой группой, соответственно, устойчивы к гидролизу *in vitro* человеческим Dcp2 - одним из декэпирующих ферментов, и о повышенной устойчивости мРНК (Grudzien et al., 2006, J. Biol. Chem., 281, 1857-67). Недавно сообщено, что фосфоротиоат в ARCA (S-ARCA) стабилизирует и повышает эффективность трансляции. Обнаружено, что мРНК люциферазы (luc), кэпированная замещением серой немостикового кислорода в  $\beta$ -фосфатной группе ARCA  $m_2^{7,2^{35}S}$ Gpp<sub>3</sub>pG (D2), транслируется в 5,1 раз более эффективно, чем нормальный кэп. Другая диастереоизомерная форма (D1) показывает 2,8-кратную более высокую эффективность трансляции. Не имеется существенного различия в эффективности трансляции между S-ARCA и ARCA. Однако обнаружено, что  $t_{1/2}$  в D2 (257 мин) пролонгируется сильнее по сравнению с нормальным кэпом (86 мин) или ARCA (155 мин). Поэтому представляется, что фосфоротиоат вносит вклад в устойчивость к гидролизу.

Хвост поли(A) играет важную роль как в трансляции, так и в устойчивости мРНК. Хвост поли(A) связывается с полиаденозилсвязывающим белком (PABP). PABP взаимодействует с N-концом eIF4G, что ведет к циркуляризации мРНК. Кроме того, хвост поли(A) способен связывать многочисленные PABP, взаимодействие которых с eIF4G приводит к возрастанию аффинности eIF4G к кэповой структуре. Взаимодействие Cap-поли(A) является совместным результатом физических взаимодействий между 5'- и 3'-концами мРНК. Как только хвост поли(A) удаляют или укорачивают до менее 12 остатков, происходит разрушение мРНК через отщепление 5'-кэповой структуры и 5'-3' расщепление эндонуклеазами или 3'-5' деградацию. Такие наблюдения поясняют, что хвост поли(A) весьма важен для ингибирования декэпирования, а также деградации мРНК. В случае транскрипции *in vitro*, если матричная плазмидная ДНК не содержит хвост поли(A/T), она может быть постполиаденилирована поли(A)полимеразой. Однако в таком случае длина хвоста поли(A) может изменяться от реакции к реакции и в пределах одного подхода, хотя такое изменение удивительно небольшое.

Представляет интерес сообщение, что хотя трансляция кэпированной полиаденилированной мРНК ингибируется добавлением экзогенного поли(A) в транс, трансляция кэпированной неполиаденилированной мРНК предпочтительнее стимулируется при некоторых концентрациях поли(A). Однако добавление экзогенного поли(A), который состоит из 10-180 остатков в транс, в лизаты кроличьих ретикулоцитов стимулирует трансляцию кэпированной мРНК с хвостом поли(A) в 100-аденозиновых остатков в 11 раз. Добавление хвоста поли(A) в интервале 15-600 остатков приводит к 2,3-кратной стимуляции экспрессии белка путем котрансфекции ARCA-мРНК luc-A100 с использованием липофекции.

Помимо того сообщается, что как кэп-структура, так и хвост поли(A) по отдельности вносят вклад в уровень экспрессии белка. В мышинных дендритных клетках (JAMSII) с использованием липофекции ARCA-мРНК luc-A64 или 100 показывает в 25 раз и 50 раз более высокую люциферазную активность, чем CAP-мРНК luc-A64 или 100, соответственно. Кроме того ARCA-мРНК luc-A100 показывает в 700 раз большую люциферазную активность, чем CAP-мРНК luc-64. Следовательно, длинный хвост поли(A) в комбинации с модифицированной кэп-структурой ARCA значительно улучшает эффективность экспрессии в дендритных клетках.

Это зависит от характера ферментативных реакций, когда люциферазная активность только косвенно измеряет уровни экспрессии белка, что означает, что остается определить фактическое действие на эффективность трансляции. Проверяли, оказывает ли влияние длина хвоста поли(A) (A0, A20, A40, A60, A80 и A100) в других типах клеток. Представляет интерес, что обнаружено, что эффективность трансляции повышается с использованием хвоста поли(A) длиной до A60, затем падает с возрастанием длины хвоста поли(A) в UMR-106 - линии остеобластоподобных клеток остеосаркомы крыс. Поэтому влияние длины поли(A) на трансляцию может зависеть от типа клеток.

Также исследовалось влияние модификаций мРНК на ее устойчивость и эффективность трансляции в дендритных клетках. Обнаружились различные важные факторы, увеличивающие устойчивость и эффективность трансляции мРНК с помощью i) увеличения длины поли(A) до A120; ii) использования рестрикционных ферментов типа IIS, таких как SapI и BpiI, для того, чтобы избежать образование выступающего хвоста поли(A) с 3'-конца и получить свободно оканчивающийся хвост поли(A), когда выполняют линеаризацию матричного плазмидного вектора; iii) двух последовательных 3'UTR гена человеческого  $\beta$ -глобина, клонированных между ORF и хвостом поли(A).

Различные реагенты трансфекции оценивались на их способность доставлять мРНК. Хотя до настоящего времени большинство публикаций предлагает для трансфекции мРНК липоплексы, полиплек-

сы на основе полиэтиленimina (PEI, 25 и 22 кД) пока приводят к более плохим результатам. Однако использование поликатионов весьма редко описывается в литературе, хотя DEAE-декстран, поли(L-лизин) и дендримеры способны трансфицировать мРНК в клетки *in vitro*.

Возможность переноса мРНК в клетки млекопитающих с использованием катионных липидов уже описана в конце 1980-х. Синтетический катионный липид DOTMA, включенный в липосому (липофектин), используют для эффективной трансфекции мРНК в различные клеточные линии *in vitro*. Различные количества применяемой мРНК дают линейную зависимость люциферазной активности. В настоящее время DOTAP оказывается наиболее эффективным и наиболее широко используемым катионным липидом, относительно дешевым и эффективным в применениях для доставки мРНК как *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, катионные полимеры можно использовать для трансфекции мРНК. Некоторые синтетические векторы на основе восстанавливающихся поликатионов по эффективности трансфекции мРНК намного превосходят PEI в 25 кД. Однако остается исследовать, можно ли такие модифицированные векторы использовать непосредственно для переноса генов *in vivo*. Что касается механизмов трансфекции, обнаружено, что прочность связывания между катионным полимером или липидом представляет один из критических параметров, которые влияют на эффективность экспрессии мРНК. В то время как катионные полимеры, такие как разветвленный PEI в 25 кД и линейный PEI в 22 кД, которые эффективны для доставки плазмидной ДНК и прочно связываются с мРНК, не приводят к детектируемой экспрессии, низкомолекулярный PEI в 2 кД связывает мРНК менее эффективно, но ведет к высоким уровням экспрессии в присутствии эндосомолитического агента, такого как хлорохин или химически связанный мелиттин, сравнимым с DOTAP. Такие наблюдения показывают, что одноцепочечная РНК связывается с катионными полимерами сильнее, чем пДНК. Предполагается, что цитозольная РНК включается в высвобождение пДНК из катионного полимера как предварительное условие для введения в ядро и транскрипции. Следовательно, создание новых катионных полимеров для доставки мРНК должно быть направлено на прочность связывания нуклеиновой кислоты, и эффективные катионные полимеры, используемые для доставки пДНК, могут не подходить для доставки мРНК.

Кроме полимерных и липосомных векторных систем, другим известным в последние годы представляющим интерес выбором является использование электропорации. Разработаны протоколы для доставки экзогенной РНК, приводящие к 50-90% эффективности трансфекции в гемопоэтических клетках человека и эмбриональных стволовых клетках человека. Так как мРНК не должна проникать в ядро, можно применять слабые электрические импульсы, снижая клеточную токсичность. Другим преимуществом электропорации может быть то обстоятельство, что РНК продвигается непосредственно в цитозоль, поэтому она не ощущается природными рецепторами РНК, что позволяет обойти нежелательные иммунные реакции.

Уже показано, что применение *in vivo* бактериальной ДНК может привести к сильным иммунным реакциям, в частности, из-за неметилированных мотивов CpG. В отличие от депротенизированной ДНК, которая индуцирует только умеренный цитокиновый ответ, ее комплексы с катионными липидами ведут к сильному цитокиновому ответу. В то время как изменение путей введения катионных липидов не сильно изменяет экспрессию воспалительных цитокинов, PEI-ДНК после внутривенной инъекции или аэрозольной доставки приводит к более низким уровням цитокинов в легких по сравнению с катионными липидами, предположительно, из-за их различного поглощения эндосомами и взаимодействия, таким образом, с рецептором TLR9.

Реакции на доставку РНК исследованы значительно меньше. Как ДНК, так и РНК стимулирует природную иммунную систему млекопитающих через активацию Toll-подобных рецепторов (TLR). У людей и мышей совместно идентифицировано тринадцать TLR (названных просто от TLR1 до TLR13), и эквивалентные формы некоторых из них найдены у других видов млекопитающих. Удивительно, но различные TLR могут узнавать некоторые структурно неродственные лиганды. Опосредуемая TLR природная иммунная система имеет структуру бабочки, в которой разнообразие патогенов и их молекулы представлены значительно меньшим числом лигандов. Субклеточная локализация различных TLR коррелирует до некоторой степени с молекулярными паттернами таких лигандов. Следовательно, TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9, которые все вовлекаются в узнавание структур, подобных нуклеиновым кислотам, локализуются внутриклеточно. TLR3 узнает дцРНК, миРНК и мРНК, в то время как TLR7 и TLR8 связывают ссРНК, и узнавание мотивов CpG ДНК опосредуется TLR9.

В соответствии с метилированием CpG ДНК (которое подавляет узнавание через TLR9) представляется, что иммуногенность РНК находится под контролем подобных типов модификации. Транскрибированная *in vitro* РНК приводит к сильной реакции ФНО-альфа дендритных клеток, если они не показывают типичных для млекопитающих модификаций. Удивительно, что модификация специфических нуклеотидов (например, N6-метиладенозин или псевдоуридин) существенно снижает опосредуемую TLR3, TLR7 и TLR8 секрецию цитокинов и активацию DC. Следовательно, возможно устранение усиленных иммунных реакций *in vivo* путем введения модифицированных NTP в реакцию транскрипции *in vitro*. Замена только 25% уридина и цитидина 2-тиоуридином или 5-метилцитидином синергично снижает связывание мРНК со структурными узнаваемыми рецепторами, такими как TLR3, TLR7, TLR8 и RIG-I, в мононуклеарных клетках периферической крови человека (PBMC). Такие модификации существенно

снижают активацию природной иммунной системы *in vitro* и *in vivo* и попутно повышают устойчивость мРНК, создавая возможность длительной клеточной экспрессии белков на высоком уровне в >80% культивированных человеческих и мышинных альвеолярных эпителиальных клетках типа II, как показывает проточная цитометрия и ELISA цитокинов супернатантов клеточных культур и сывороток мышинной крови. Преодоление присущей мРНК иммуногенности считается критичным для создания возможности для новых терапий, требующих многократного дозирования, например, для лечения наследственных заболеваний или болезней обмена веществ или в области регенеративной медицины.

В противоположность вышеизложенному сильное иммуностимулирующее действие РНК используют для терапевтической вакцинации. В частности, дендритные клетки (DC) как антигенпредставляющие клетки (APC) являются мишенями вакцинных иммуногенов, за которыми следует активация антигенспецифических Т- и В-клеток. Некоторые исследования *in vivo* и *in vitro* показывают, что попадание в мишени DC мРНК вызывает иммунитет к опухолям или противоопухолевые реакции. По сравнению с трансфекцией пДНК перенос генов на основе мРНК ведет к более высокому содержанию опухолевых антигенов в DC и имеет более высокий потенциал для стимулирования реакции цитотоксичных Т-лимфоцитов. Кроме противоопухолевых подходов появилось стремление использовать трансфицированные РНК DC для лечения или предупреждения инфекционных заболеваний, подобных СПИДу, гепатиту С или грибковой инфекции. Другой простой стратегией для достижения вакцинации РНК должна быть экспрессия антигена-мишени бицистронной репликативной РНК, которая кодирует как антиген, так и РНК-репликазу, причем посредством этого используется способность альфавирусов продуцировать большие количества вирусной мРНК. Если клетка трансфицирована, вирусная РНК амплифицируется репликационным комплексом, который синтезирует геномную отрицательную цепь, которая сама представляет собой матрицу для синтеза многих геномных РНК-положительных цепей РНК-репликазой. Такой подход уже использовался на мышинной модели для разрушения толерантности и обеспечения иммунитета к меланоме.

Теперь настоящее изобретение создает возможность для подходящего пути эффективной доставки мРНК в клетки легких и возможности эффективной экспрессии в таких клетках белка, кодированного мРНК.

Изобретение поясняется подробнее приведенными далее примерами и прилагаемыми чертежами, но не ограничивается ими.

Фиг. 1 показывает результаты экспрессии ЕРО, определенные ELISA, в легочном лизате мышей через 24 ч после аэрозольной обработки комбинацией, включающей мРНК ЕРО и PEI в 25 кД (показана ЕРО) или модифицированной мРНК ЕРО и PEI в 25 кД (показана ЕРО мод), в сравнении с мышами без обработки (w/o). Уровни ЕРО существенно повышены для обеих обработанных групп по сравнению с группой мышей без обработки.

Фиг. 2 показывает результаты экспрессии люциферазы Metridia, определенные по люминисцентной активности, в легочном лизате мышей через 24 ч после аэрозольной обработки комбинацией, включающей химически модифицированную мРНК MetLuc и PEI в 25 кД (показана MetLuc), или включающей химически модифицированную мРНК EGFPLuc и PEI в 25 кД (показана EGFPLuc), которая служит в качестве контроля. Уровни люциферазы Metridia существенно повышены в группе мышей, обработанных смесью химически модифицированной мРНК MetLuc/PEI в 25 кД, по сравнению с группой мышей, обработанных смесью химически модифицированной EGFPLuc/PEI в 25 кД.

Фиг. 3 показывает, что химически модифицированная мРНК Luc эффективно экспрессируется в клетках легких мышей после ингаляционной аэрозольной доставки в виде комбинации с PEI в 25 кД (фиг. 3a+b).

Фиг. 4 показывает, что экспрессия люциферазы наивысшая для химически модифицированной мРНК Luc, включающей кэп-1.

Фиг. 5 показывает, что химически модифицированная мРНК Luc эффективно экспрессируется в клетках легких свиньи после ингаляционной аэрозольной доставки в виде комбинации с PEI в 25 кД (фиг. 5B), в то время как экспрессия Luc не отмечается в легких контрольных животных, обработанных распыленной водой (фиг. 5A).

Фиг. 6 показывает, что вода для инъекции (WFI) стабилизирует химически модифицированную мРНК в композициях с PEI; полосы:

- 1 - модифицированная мРНК + вода + гепарин;
- 2 - модифицированная мРНК + PBS + гепарин;
- 3 - разв. PEI в 25 кД/модифицированная мРНК, pH 7,4, в PBS/вода + гепарин (способ согласно Densmore et al., EP 1173224 B1);
- 4 - разв. PEI в 25 кД/модифицированная мРНК, pH 7,4, в PBS + гепарин (способ Ethris);
- 5 - разв. PEI в 25 кД/модифицированная мРНК, pH 7,4, в воде + гепарин;
- 6 - разв. PEI в 25 кД/модифицированная мРНК, pH 6,0, в воде + гепарин;
- 7 - разв. PEI в 25 кД/модифицированная мРНК, pH 5,0, в воде + гепарин.

### Примеры

1. Применение *in vivo* аэрозоля химически модифицированной и немодифицированной мРНК, кодирующей эритропоэтин (EPO) и люциферазу Metridia (metLuc), в комбинации с полиэтиленгликолем (PEG) к легким мышей

### Химикаты

Разветвленный PEG (средняя MW = 25 кД) получают у Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Германия) и используют без дополнительной очистки. PEG разбавляют бидистиллированной водой, и доводят pH до 7 HCl. Бидистиллированную воду без эндотоксинов закупают у Delta Pharma (Boehringer Ingelheim, Германия).

### Получение мРНК

#### Клонирование кДНК мышинового EPO (мEPO) в вектор pVAXA120

Кодирующую мEPO кДНК вырезают из плазмиды pCR4EPO (закупают у Open Biosystems, каталожный номер MMM1013-99829153) через расщепление EcoRI и клонируют в соответствующий сайт pVAXA120. Клоны скринируют на наличие вставки с использованием расщепления PmeI и для ориентации с использованием NheI (одно расщепление) и SmaI-XbaI (двойное расщепление). Клоны, которые корректны со всеми тремя расщеплениями, используют для получения РНК.

#### Получение мРНК мEPO

Для того чтобы получить матрицу для транскрипции *in vitro*, плазмиду линейаризируют в прямом направлении хвоста поли(A) при расщеплении в течение ночи XbaI (Fermentas) при 37°C и очищают с использованием экстракции хлороформом и осаждения ацетатом натрия, как описано в Sambrook et al. (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989), in Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. Vol. 1, 2, 3). Полную линейаризацию плазмидной матрицы подтверждают в 1% агарозном геле.

Транскрипцию *in vitro* pVAXA120-мEPO осуществляют с системой получения РНК в крупном масштабе RiboMAX-T7 (Promega, Германия) при 30 и 37°C, следуя протоколу изготовителя, с использованием антиреверсного кэпового аналога (ARCA; P1-(5'-(3'-о-метил)-7-метилгуанозил)P3-(5'-(гуанозил))трифосфат, натриевая соль, Jena Biosciences, Германия). Для транскрипции *in vitro* химически модифицированной мРНК мEPO (EPO мод) 25% как цитидин-5'-трифосфата, так и уридин-5'-трифосфата заменяют 5-метилцитидин-5'-трифосфатом (TriLink, США) и 2-тиоуридин-5'-трифосфатом (TriLink, США). Очистку мРНК осуществляют экстракцией хлороформом и эксклюзионной хроматографией на колонках PD-10 (GE Healthcare, Германия). Полученную мРНК скринируют на активность путем трансфекции линии бронхиальных эпителиальных клеток (BEAS-2B) и линии эмбриональных эпителиальных клеток почки человека (HEK 293) и измерения количеств мEPO ELISA (R&D Systems, Германия). Существенно большие количества мEPO можно определить в BEAS-2B, трансфицированных мРНК мEPO, полученной при 30°C, по сравнению с ее эквивалентом, полученным при 37°C.

#### Клонирование ORF люциферазы Metridia (MetLuc) в вектор pVAXA120

ORF, кодирующую MetLuc (Clonetech sequence) синтезируют и клонируют в сайты BamHI I EcoRI pVAXA120 с помощью GeneArt AG (Германия). Полученную плазмиду pVAXA120-MetLuc затем используют для транскрипции *in vitro*.

#### Получение химически модифицированной мРНК MetLuc

Для того чтобы получить матрицу для транскрипции *in vitro*, плазмиду pVAXA120-MetLuc линейаризируют в прямом направлении хвоста поли(A) путем расщепления в течение ночи XbaI (Fermentas) при 37°C и очищают с использованием экстракции хлороформом и осаждения ацетатом натрия, как описано в Sambrook et al. (Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. (1989), in Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. Vol. 1, 2, 3). Полную линейаризацию плазмидной матрицы подтверждают в 1% агарозном геле.

Транскрипцию *in vitro* pVAXA120-MetLuc осуществляют с системой получения РНК в крупном масштабе RiboMAX - T7 (Promega, Германия) при 30°C, следуя протоколу изготовителя, с использованием антиреверсного кэпового аналога (ARCA; P1-(5'-(3'-о-метил)-7-метилгуанозил)P3-(5'-(гуанозил))трифосфат, натриевая соль, Jena Biosciences, Германия). Для транскрипции *in vitro* химически модифицированной мРНК MetLuc 25% как цитидин-5'-трифосфата, так и уридин-5'-трифосфата заменяют 5-метилцитидин-5'-трифосфатом (TriLink, США) и 2-тиоуридин-5'-трифосфатом (TriLink, США). Очистку мРНК осуществляют экстракцией хлороформом и эксклюзионной хроматографией на колонках PD-10 (GE Healthcare, Германия). Полученную мРНК скринируют на активность путем трансфекции линии мышинных фибробластов (NIH 3T3) и измерения активности MetLuc с использованием репортерного анализа люциферазы Metridia.

### Животные

Получают шести-восьминедельных самок мышей BALB/c у Janvier, Route Des Chênes SecsBP5, F-53940 Le Genest St. Isle, Франция и выдерживают в специфических безпатогенных условиях. Мышей перед экспериментами акклиматизируют к окружающей среде в виварии в течение по меньшей мере семи дней. Все процедуры с животными утверждены и контролируются местным комитетом по этике и выполняются согласно положениям Закона Германии о защите жизни животных.

### Получение полиплексов PEI-мРНК

Полиплексы получают следующим образом: мРНК и PEI разводят в 4,0 мл бидистиллированной воды, получая концентрацию мРНК 250 мкг/мл и PEI 326,3 мкг/мл соответственно (соответствующие отношению N/P 10). Раствор мРНК переносят пипеткой в раствор PEI, смешивают, втягивая и выпуская из пипетки, и получают конечную концентрацию мРНК 125 мкг/мл. Комплексы перед использованием инкубируют в течение 20 мин при температуре окружающей среды. По ходу настоящего изобретения наблюдают, что для образования комплексов определенно выгодно использовать только воду без каких-либо буферов, поскольку в ином случае наночастицы могут образовывать агрегаты или быть неэффективными в легких мышей (Rudolph et al., J. Mol. Ther., 2005, 12: 493-501).

### Конструкция аэрозольных устройств

Для процедуры распыления в устройстве для всего организма мышей помещают в пластиковый ящик 9,8×13,2×21,5 см, который может быть плотно закрыт крышкой. С одной узкой стороны ящика располагаются четыре небольших отверстия для поступления аэрозоля. Через целое в противоположной узкой стороне ящик соединен через соединительную часть диаметром 2,1 см с пластиковым цилиндром 15,4 см (ширина)×41,5 см (длина). Дно цилиндра равномерно покрыто 150 г силикагеля (1-3 мм, #85330; Fluka, Швейцария) для осушения аэрозоля, который вырабатывается струйным небулайзером (PARI BOY® LC plus, PARI GmbH), соединенным с другим концом цилиндра (детали описаны в Rudolph et al., J. Gene Med., 2005, 7: 59-66).

### Измерение активности EPO и MetLuc в гомогенатах легких

Через 24 ч после введения мышам дают наркоз интраперитонеальной инъекцией медетомидина (11,5 мкг/кг BW), мидазолама (115 мкг/кг BW) и фентанила (1,15 мкг/кг BW) и вскрывают брюшину срединными разрезами. После вскрытия брюшины срединными разрезами у животных иссекают легкие и перфузируют PBS. Легкие мгновенно замораживают в жидком азоте и гомогенизируют в замороженном состоянии с помощью ступки и пестика. После добавления 400 мкл буфера для лизиса, содержащего 25 мМ трис, pH 7,4, 0,1% тритона X-100 и полный ингибитор протеаз (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Германия), образцы инкубируют в течение 20 мин на льду. Затем белковые лизаты центрифугируют при 10000 gcf, 5 мин. Активность EPO в супернатанте измеряют ELISA (R&D Biosystems), и активность MetLuc анализируют, измеряя люминесцентную активность после добавления коэлюцентразина, как описано в Honig et al., Biomacromolecules, 2010, 11: 1802-1809.

### Результаты

Первый эксперимент показывает, что как немодифицированная, так и модифицированная мРНК EPO эффективно экспрессируется в клетках легких животных после ингаляционной аэрозольной доставки в виде комбинации с PEI в 25 кД. Это показывает, что способ доставки в легкие не зависит от химического состава мРНК. Второй эксперимент показывает, что люцифераза Metridia эффективно экспрессируется в клетках легких животных после ингаляционной аэрозольной доставки в виде комбинации с PEI в 25 кД. Это показывает, что способ доставки в легкие не ограничивается одной кодирующей мРНК, но не зависит от последовательности кодирующей мРНК. Вместе это показывает, что объект настоящего изобретения может быть правильно указан способом и фармацевтическими препаратами по настоящему изобретению.

2. Применение *in vivo* аэрозоля химически модифицированной мРНК, кодирующей люциферазу светлячков (Luc), в композиции с полиэтиленимином (PEI) к легким мышей

### Химикаты

Разветвленный PEI (средняя MW = 25 кД) получают у Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Германия) и используют без дополнительной очистки. PEI разбавляют водой для инъекции и доводят pH до 7 HCl. Воду без эндотоксинов закупают у B.Braun (Melsungen, Германия).

### Получение химически модифицированной мРНК Luc

Для того, чтобы получить матрицу для транскрипции *in vitro* (IVT), плазмиду pVAXA120-Luc лиnearизируют путем расщепления рестриктазой NotI. Затем матрицу очищают осаждением из хлороформа-этанола. Качество матрицы определяют электрофорезом в нативном агарозном геле. IVT осуществляют со стандартной смесью для IVT, содержащей рибонуклеотидтрифосфаты, антиреверсный кэповый аналог (ARCA, m<sup>7,3'0</sup>GpppG) и РНК-полимеразу T7. Модификации вводят с использованием 25% 5-метилцитидин-5'-трифосфата и 25% 2-тиоуридин-5'-трифосфата. ARCA используют для обеспечения введения кэпа только в желательной ориентации. Для того, чтобы получить структуру кэп-0 или кэп-1 с использованием процедуры посткэпирования, IVT выполняют без какого-либо кэпового аналога, что приводит к мРНК, содержащей 5'-концевой трифосфат. Кэпирование выполняют с использованием кэпирующего фермента вируса коровьей оспы, rGTR и S-аденозилметионина (SAM) в качестве донора метила, для присоединения структуры кэп-0 7-метилгуанилата (m7GpppG) к 5'-концу мРНК. Для того, чтобы добавить метильную группу в позицию 2'-о первого нуклеотида, соседнего со структурой кэп-0 в 5'-конце мРНК, полученной при посткэпировании, используют мРНК-кэп-2'-о-метилтрансферазу и SAM. Такое метилирование приводит к структуре кэп-1 (m7GpppGm) кэпа мРНК. Очистку мРНК осуществляют осаждением ацетатом аммония. Модифицированную РНК Luc ресуспендируют в воде для инъекции,

и контроль качества выполняют с использованием УФ-измерения, электрофореза в нативном агарозном геле и трансфекции клеток МНЗТЗ.

#### **Животные**

Получают шести-восьминедельных самок мышей BALB/c у Janvier, Route Des Chênes SecsBP5, F-53940 Le Genest St. Isle, Франция, и выдерживают в специфических безпатогенных условиях. Мышей перед экспериментами акклиматизируют к окружающей среде в виварии в течение, по меньшей мере, семи дней. Все процедуры с животными утверждены и контролируются местным комитетом по этике и выполняются согласно положениям Закона Германии о защите жизни животных.

#### **Получение полиплексов PEI-мРНК**

Полиплексы получают следующим образом: мРНК и PEI разводят в 4,0 мл бидистиллированной воды, получая концентрацию мРНК 250 мкг/мл и PEI 326,3 мкг/мл, соответственно (соответствующие отношению N/P 10). Раствор мРНК переносят пипеткой в раствор PEI, смешивают, втягивая и выпуская из пипетки, и получают конечную концентрацию мРНК 125 мкг/мл. Комплексы перед использованием инкубируют в течение 20 мин при температуре окружающей среды. По ходу настоящего изобретения наблюдают, что для образования комплексов определено выгодно использовать только воду без каких-либо буферов, поскольку в ином случае наночастицы могут образовывать агрегаты или быть неэффективными в легких мышей (Rudolph et al., J. Mol. Ther., 2005, 12: 493-501).

#### **Конструкция аэрозольных устройств**

Для процедуры распыления в устройстве для всего организма мышей помещают в пластиковый ящик 9,8×13,2×21,5 см, который может быть плотно закрыт крышкой. С одной узкой стороны ящика располагаются четыре небольших отверстия для поступления аэрозоля. Через целое в противоположной узкой стороне ящик соединен через соединительную часть диаметром 2,1 см с пластиковым цилиндром 15,4 см (ширина) × 41,5 см (длина). Дно цилиндра равномерно покрыто 150 г силикагеля (1-3 мм, #85330; Fluka, Швейцария) для осушения аэрозоля, который вырабатывается струйным небулайзером (PARI BOY® LC plus, PARI GmbH), соединенным с другим концом цилиндра (детали описаны в Rudolph et al., J. Gene Med., 2005, 7: 59-66).

#### **Измерение активности Luc в легких мышей с использованием биолюминесцентной визуализации in vivo**

Через 24 ч после введения мышам дают наркоз интраперитонеальной инъекцией медетомидина (11,5 мкг/кг BW), мидазолама (115 мкг/кг BW) и фентанила (1,15 мкг/кг BW). Интраназальным путем применяют субстрат D-люциферина (3 мг/50 мкл PBS на мышь) (Buckley S.M., Howe S.J., Wong S.P., Buning H., McIntosh J. et al. (2008), Luciferin detection after intra-nasal vector delivery is improved by intra-nasal rather than intra-peritoneal luciferin administration, Hum. Gene Ther.). Через 10 мин измеряют биолюминесценцию с использованием системы IVIS 100 Imaging (Xenogen, Alameda, США) и параметров камеры: область обзора 10, f-стоп f1, биннинг высокого разрешения и время экспозиции 10 мин. Сигнал квантуют и анализируют с использованием программы Living Image Software, версия 2.50 (Xenogen, Alameda, США).

#### **Результаты**

Эксперимент показывает, что химически модифицированная мРНК Luc эффективно экспрессируется в клетках легких мышей после ингаляционной аэрозольной доставки в виде комбинации с PEI в 25 кД (фиг. 3). Экспрессия люциферазы самая высокая в случае химически модифицированной мРНК Luc, включающей кэп-1 (фиг. 4). Вместе это показывает, что объект настоящего изобретения может быть правильно указан способом и фармацевтическими препаратами по настоящему изобретению.

3. Применение in vivo аэрозоля химически модифицированной мРНК, кодирующей люциферазу светлячков (Luc), в композиции с полиэтиленгликолем (PEG) к легким свиньи

#### **Химикаты**

См. описанный выше пример 2.

#### **Получение химически модифицированной мРНК Luc**

См. описанный выше пример 2.

#### **Экспериментальная процедура**

Седацию у свиньи вызывают премедикацией 2 мг/кг массы тела азаперона, 15 мг/кг массы тела кетамина, 0,1 мг/кг массы тела атропина с последующим присоединением системы для внутривенного введения к латеральной ушной вене. Свинье дают наркоз внутривенной инъекцией 3-5 мг/кг массы тела, как требуется. Анестезию поддерживают непрерывной внутривенной инфузией 1% пропофола, сколько требуется. Параметры дыхания совмещают с эндэкспираторным давлением диоксида углерода и при необходимости регулируют. Анестезию, дыхание и сердечно-сосудистые параметры непрерывно контролируют с использованием пульсовой оксиметрии, капнографии, измерения ректальной температуры и рефлекторного статуса. Свинья получает инфузию сбалансированного раствора электролита в количестве 10 мл/кг/ч. Длительность анестезии составляет приблизительно 80-120 мин. Свинью убивают болюсной инъекцией пентобарбитала - 100 мг/кг массы тела, через латеральную ушную вену после седации после завершения применения аэрозоля (меш-небулайзер Aeroneb). Легкие иссекают и собирают срезы образ-

цов ткани толщиной приблизительно 1 см из различных участков легких с последующей инкубацией в инкубаторе в клеточной культуральной среде в течение 24 ч при 37°C (5% диоксида углерода). Для измерения люциферазной активности образцы ткани инкубируют в ванне со средой, включающей субстрат D-люциферин в PBS (100 мкг/мл), при 37°C в течение 30 мин и подвергают процедуре биолюминесцентной визуализации люциферазы (IVIS 100, Xenogen, Alameda, США).

#### Получение полиплексов PEI-мРНК

Полиплексы получают с использованием двухканального шприц-насоса (KDS-210-CE, KD Scientific). Как мРНК, так и PEI разводят в 12,0 мл бидистиллированной воды, получая концентрацию мРНК 500 мкг/мл и PEI 650 мкг/мл соответственно (соответствующие отношению N/P 10). Оба раствора загружают в отдельные 20-мл шприцы с использованием функции всасывания шприц-насоса со скоростью 5 мл/мин. Для того, чтобы смешать оба образца, оба шприца соединяют через трубку (Safeflow Extension Set, B. Braun) т-образной формы. Смешивание выполняют с использованием функции инфузии шприц-насоса со скоростью 40 мл/мин. Комплексы перед использованием инкубируют в течение 30 мин при температуре окружающей среды. По ходу настоящего изобретения наблюдают, что для образования комплексов определенно выгодно использовать только воду без каких-либо буферов, поскольку в ином случае наночастицы могут образовывать агрегаты или быть неэффективными в легких мышей (Rudolph et al., J. Mol. Ther, 2005, 12: 493-501).

#### Результаты

Эксперимент показывает, что химически модифицированная мРНК Luc эффективно экспрессируется в клетках легких свиньи после ингаляционной аэрозольной доставки в виде комбинации с PEI в 25 кД (фиг. 5B), в то время как экспрессии в легких контрольных животных, обработанных распыленной водой, не наблюдают (фиг. 5A). Вместе это показывает, что объект настоящего изобретения может быть правильно указан способом и фармацевтическими препаратами по настоящему изобретению.

4. Вода для инъекции (WFI) стабилизирует химически модифицированную мРНК в композициях с PEI

Действие воды для инъекции в сравнении с PBS на устойчивость мРНК проверяют электрофорезом в агарозном геле (фиг. 6). В то время как в комплексе мРНК с PEI в PBS разрушение мРНК происходит уже после 4 ч инкубации при комнатной температуре, как показывает размывание продуктов разложения мРНК, композиции PEI/мРНК в WFI заметно стабилизированы, на что указывает меньшее количество продуктов разложения мРНК (фиг. 5) и большая интенсивность полосы основного продукта мРНК. Такой эффект более отчетлив для крупной мРНК, такой как мРНК CFTR, чем для более короткой мРНК Luc, и становится еще очевиднее после инкубации при комнатной температуре в течение 24 ч. Важно, что разложение мРНК снижается со снижением pH и достигает минимума при pH=5. Такое наблюдение объясняет наиболее благоприятные свойства и необходимость использования WFI для аэрозольной доставки в композиции с PEI, поскольку WFI как правило имеет кислый pH с величинами pH=5, и поэтому по своему существу придает устойчивость мРНК к разрушению в водной композиции с PEI

#### Экспериментальная процедура

Получение полиплексов мРНК-PEI.

Получают исходные растворы разветвленного PEI в 25 кД (Sigma-Aldrich, Schnellendorf) в концентрации 10 мг/мл и 5 мг/мл или в воде для инъекции (WFI, B. Braun, Melsungen) или в PBS по Дюльбекко (Life technologies, Darmstadt), и доводят pH с помощью HCl до pH 7,4, pH 6,0 или pH 5,0.

Разводят 25 мкл модифицированной мРНК (1 мкг/мл) и 3,3 мкл исходного раствора PEI (10 мг/мл) в 50 мкл WFI или D-PBS, получая концентрации 0,5 мкг/мл мРНК и 0,66 мкг/мл PEI соответственно (соответствующие отношению N/P 10). Согласно патенту (EP 1173224 B1), 25 мкл модифицированной мРНК (1 мкг/мл) и 6,6 мкл исходного раствора PEI в D-PBS (5 мг/мл) разводят в 50 мкл WFI. Раствор PEI медленно перемешивают и в него добавляют раствор ДНК до получения конечного объема 100 мкл. Смесь перед применением оставляют стоять при комнатной температуре в течение 20 мин.

Для анализа высвобождения с использованием электрофореза в нативном агарозном геле 1 мкл раствора полиплекса добавляют к 4 мкл раствора гепарина (40 мг/мл в WFI). Смесь инкубируют при комнатной температуре в течение 10 мин. После инкубации добавляют 5 мкл 2X красителя для нанесения РНК (Thermo Fisher) и образцы инкубируют при 70°C в течение 10 мин. Затем образцы помещают на лед на 2 мин и затем наносят на 1% агарозный гель. Гель работает при 180 В в течение 1-1,5 ч, и его визуализируют с использованием системы Intas Gel Documentation System.

#### ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ доставки терапевтической мРНК в легкие для продукции белка, кодируемой указанной терапевтической мРНК, на эффективном уровне в клетках легких, причем указанный способ включает неинвазивное ингаляционное введение полиплекса мРНК и полиэтиленimina (PEI), предоставленного в форме, подходящей для усвоения через легкие, посредством чего указанный полиплекс проникает в клетки легких, и указанная мРНК экспрессируется в клетках легких, где PEI имеет молекулярную массу от 1 до 1000 кД.

2. Способ по п.1, в котором PEI имеет молекулярную массу от 10 до 50 кД, в частности от 20 до 30 кД.

3. Способ по любому из пп.1, 2, в котором мРНК кодирует муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости (CFTR), сурфактантный белок В (SPB), член 3 подсемейства А АТФ-связывающей кассеты (ABCA3), альфа-1-антитрипсин (A1AT), сурфактантный белок С (SPC), эритропоэтин, фактор VIII, фактор IX, фактор фон Виллебранда, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ADAMTS 13, гепсидин, ангиотензинпревращающий фермент II или антигены вирусных и бактериальных патогенов.

4. Способ по любому из пп.1-3, в котором полиплекс мРНК и PEI вводят в легкие интратрахеально, предпочтительно в виде аэрозоля, в частности, распылением при высоком давлении.

5. Способ по п.4, в котором аэрозоль содержит магнитные частицы, в частности магнитные частицы диаметром от 5 до 800 нм.

6. Способ по п.4, в котором PEI дополнительно соединен с магнитными частицами.

7. Способ по любому из пп.5 или 6, в котором аэрозоль, содержащий магнитные частицы, осаждают магнитным полем на поверхность легких, подлежащих лечению.

8. Способ по п.7, при этом магнитное поле имеет напряженность по меньшей мере 100 мТл (милли-тесла), по меньшей мере 200 мТл, по меньшей мере 500 мТл или по меньшей мере 1 Тл (тесла).

9. Способ по любому из пп.7 или 8, в котором магнитное поле имеет градиент магнитного поля, превышающий 1 Т/м или превышающий 10 Т/м.

10. Способ по любому из пп.7-9, в котором магнитное поле представляет собой пульсирующее, переменное или пульсирующее переменное магнитное поле.

11. Способ по любому из пп.7-10, в котором магнитное поле динамически соответствует дыханию пациента и активно только во время пауз отдыха между вдыханием и выдыханием или выдыханием и вдыханием.

12. Применение способа по любому из пп.1-11 для лечения дефекта легких, вызванного геном, который имеет патогенное действие в легких для пациента.

13. Применение по п.12, в котором пациентом является человек.

14. Применение по п.12, где дефект легких выбран из недостаточности сурфактантного белка В (SPB), недостаточности члена 3 подсемейства А АТФ-связывающей кассеты (ABCA3), муковисцидоза, недостаточности альфа-1-антитрипсина (A1AT), рака легких, недостаточности сурфактантного белка С (SPC), альвеолярного протеиноза, саркоидоза, острого и хронического бронхита, эмфиземы, синдрома Маклеода, хронической обструктивной болезни легких (COPD), бронхиальной астмы, бронхоэктаза, пневмокониоза, асбестоза, острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), респираторного дистресс-синдрома у детей (IRDS), отека легких, легочной эозинофилии, пневмонии Леффлера, синдрома Хаммена-Рича, идиопатического легочного фиброза, интерстициальных заболеваний легких, первичной цилиарной дискинезии, легочной артериальной гипертензии (ПАН) и недостаточности STAT5b, дефектов свертывания крови, в частности гемофилии А и В; дефектов комплемента, в частности недостаточности белка С, тромбоцитопенической тромбогемолитической пурпуры и врожденного гемохроматоза, в частности недостаточности гепсидина; легочных инфекционных заболеваний, предпочтительно респираторно-синцитиальной вирусной инфекции (RSV), парагриппозной вирусной инфекции (PIV), гриппозной вирусной инфекции, риновирусной инфекции и тяжелого острого респираторного синдрома (коронавирусной (SARS-CoV) инфекции), туберкулеза, синегнойной инфекции, инфекции *Burkholderia cepacia*, метициллин-резистентной золотистостифилококковой инфекции (MRSA) и инфекции *Haemophilus influenzae*.

15. Фармацевтическая композиция для доставки терапевтической мРНК в легкие для продукции белка, кодируемой указанной терапевтической мРНК, на эффективном уровне в клетках легких, причем указанная фармацевтическая композиция содержит полиплекс указанной мРНК и PEI, где мРНК способна экспрессировать указанный кодируемый белок в клетках легких и PEI имеет молекулярную массу 1-1000 кД, где композиция обеспечивается в форме, подходящей для усвоения через легкие.

16. Фармацевтическая композиция по п.15, в которой PEI дополнительно соединен с магнитными частицами.

17. Фармацевтическая композиция по любому из пп.15, 16, в которой PEI имеет молекулярную массу от 10 до 50 кД, в особенности от 20 до 30 кД.

18. Фармацевтическая композиция по любому из пп.15-17, состоящая из:

(i) указанных мРНК и PEI;

(ii) указанных мРНК и PEI и

(А) дистиллированной воды;

(В) фармацевтически приемлемой воды/воды для инъекции (WFI);

(С) автоклавированной воды высшей степени очистки или

(D) водопроводной воды; или

(iii) (i) или (ii) и (а) фармацевтически приемлемого носителя (носителей) и/или (а) дополнительных вспомогательных соединений.

19. Фармацевтическая композиция по любому из пп.15-18, в которой мРНК кодирует муковисцидозный трансмембранный регулятор проводимости (CFTR), сурфактантный белок В (SPB), член 3 подсемейства А АТФ-связывающей кассеты (ABCA3), альфа-1-антитрипсин (A1AT), сурфактантный белок С (SPC), эритропоэтин, фактор VIII, фактор IX, фактор фон Виллебранда, гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор, ADAMTS 13, гепцидин, ангиотензинпревращающий фермент II или антигены вирусных и бактериальных патогенов.

20. Фармацевтическая композиция по любому из пп.15-19, дополнительно включающая по меньшей мере один фторуглерод, где указанный фторуглерод включает перфторуглероды, подходящие для использования при лечении аэрозолями.

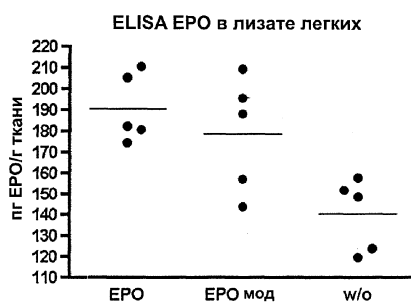
21. Фармацевтическая композиция по любому из пп.15-20, выполненная в форме аэрозоля.

22. Фармацевтическая композиция по п.21, в которой аэрозоль содержит магнитные частицы, в частности магнитные частицы диаметром от 5 и до 800 нм.

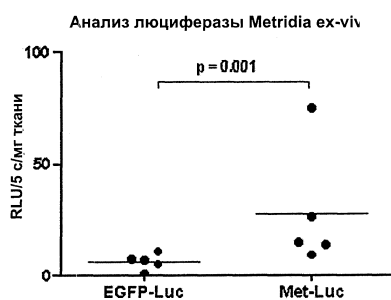
23. Фармацевтическая композиция по п.22, в которой магнитные частицы имеют диаметр от 50 и до 750 нм, предпочтительно от 100 и до 700 нм, предпочтительнее от 150 и до 600 нм, еще предпочтительнее от 200 и до 500 нм, особенно предпочтительно от 250 и до 450 нм, наиболее предпочтительно от 300 и от 400 нм.

24. Фармацевтическая композиция по любому из пп.16-23, в которой магнитные частицы состоят из металлов и/или их оксидов и/или гидроксидов или содержат металлы и/или их оксиды и/или гидроксиды.

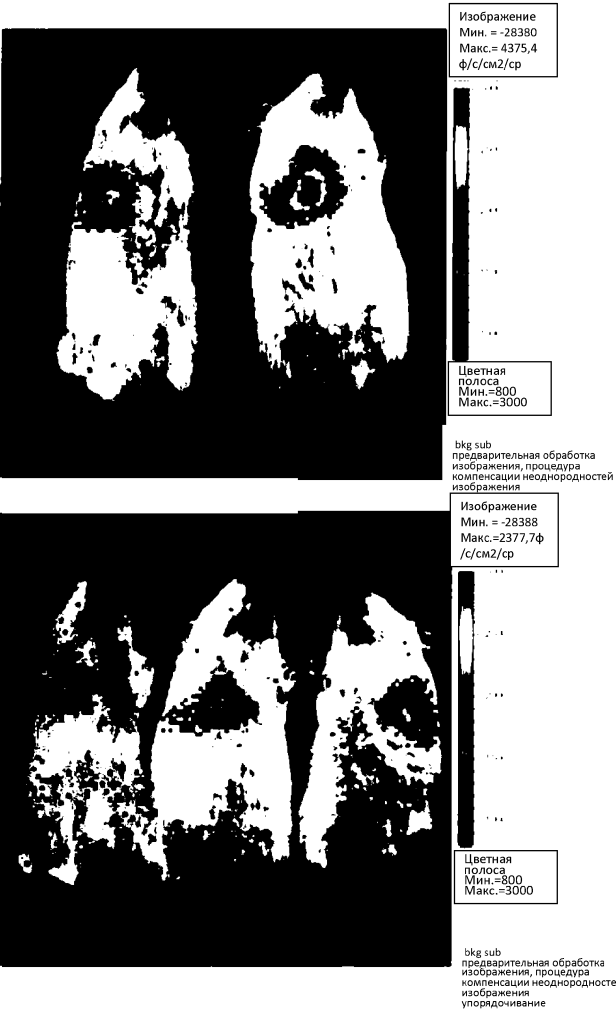
25. Фармацевтическая композиция по п.24, в которой металлы выбирают из железа, кобальта или никеля и оксиды или гидроксиды выбирают из  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ , двойных оксидов или гидроксидов двух- или трехвалентных ионов железа с  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ,  $\text{Gd}^{3+}$ ,  $\text{Dy}^{3+}$  или  $\text{Sm}^{3+}$  и их любых смесей.



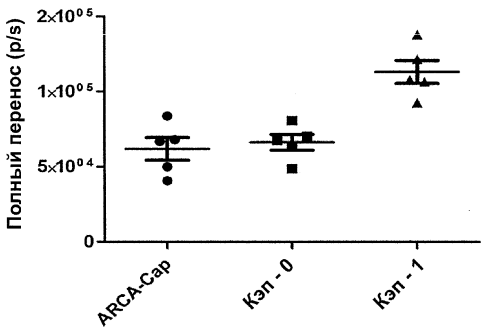
Фиг. 1



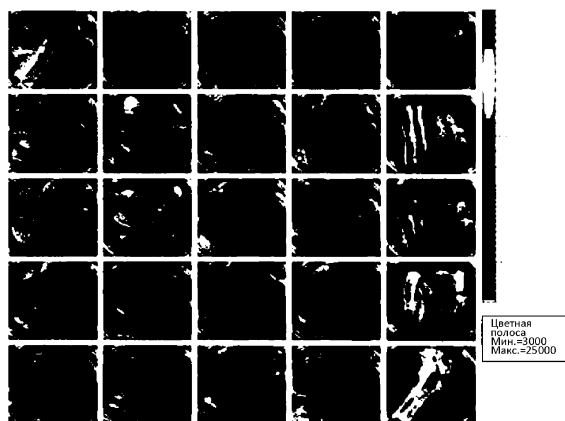
Фиг. 2



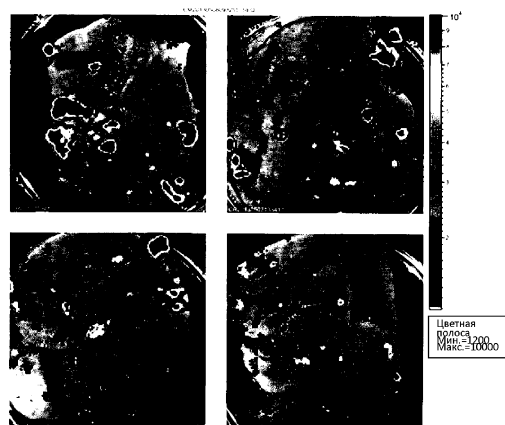
Фиг. 3а; 3б



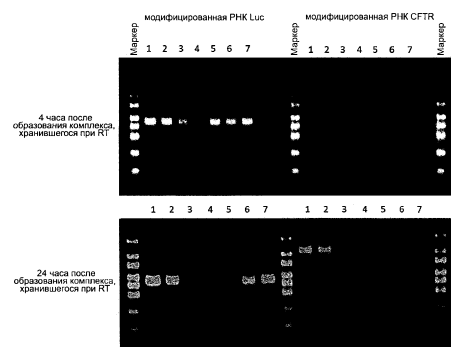
Фиг. 4



Фиг. 5a



Фиг. 5b



Фиг. 6

