

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 994 656**

51 Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

A61K 47/69 (2007.01)

A61K 9/51 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.10.2021 PCT/EP2021/078320**

87 Fecha y número de publicación internacional: **21.04.2022 WO22079105**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.10.2021 E 21794765 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.08.2024 EP 4196097**

54 Título: **Polvo seco de ARNip nano-en-microencapsulado, método para producir el mismo y uso de una formulación en polvo como forma farmacéutica, en particular, para la administración pulmonar**

30 Prioridad:

13.10.2020 EP 20201629

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

29.01.2025

73 Titular/es:

LUDWIG-MAXIMILIANS-UNIVERSITÄT MÜNCHEN (50.00%)

**Geschwister-Scholl-Platz 1
80539 München, DE y**

THE UNIVERSITY OF BRITISH COLUMBIA (50.00%)

72 Inventor/es:

MERKEL, OLIVIA MONIKA;

KEIL, TOBIAS;

ZIMMERMANN, CHRISTOPH MARTIN;

BALDASSI, DOMIZIA;

WITZIGMANN, DOMINIK y

CULLIS, PIETER RUTTER

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES, S.L.P.

ES 2 994 656 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Polvo seco de ARNip nano-en-microencapsulado, método para producir el mismo y uso de una formulación en polvo como forma farmacéutica, en particular, para la administración pulmonar

[0001] La presente invención se refiere a un método para producir un polvo seco de ARNip nano-en-microencapsulado (NIM, *Nano-in-Micro*) de acuerdo con la reivindicación 1. La invención se refiere además a un polvo seco que comprende ARNip nano-en-microencapsulado de acuerdo con la reivindicación 12. La invención se refiere además a un uso de una composición o mezcla en polvo de acuerdo con las reivindicaciones 15 y 16.

[0002] La aplicación de los fármacos directamente en su lugar de acción es la forma óptima de reducir las dosis y los efectos secundarios. Para las neumopatías, tales como el asma, se favorece por lo tanto el suministro pulmonar. [1] Con una actividad enzimática relativamente baja y un aclaramiento superficial lento [2], las sustancias con propensión enzimática son candidatas perfectas para esta vía de administración. Además, los inhaladores de polvo seco permiten el suministro de fármacos con un período de validez elevado y también proporcionan una herramienta fácil de usar para los pacientes junto con un elevado cumplimiento terapéutico. [3] A pesar de los diversos tratamientos disponibles para las enfermedades pulmonares, la terapia génica es una nueva y prometedora herramienta para abordar variantes de enfermedades incontrolables, tales como el asma grave no controlada, pero también, en particular, virus para los que no se dispone de compuestos antivirales. Conocer el genoma del virus es suficiente para desarrollar terapias basadas en ácidos nucleicos que puedan inhibir la replicación viral. [4] El ARN interferente pequeño (ARNip) puede silenciar la traducción del ARN mensajero en proteínas patológicamente reguladas y disminuir los síntomas de la enfermedad. [5] Sin embargo, las terapias con ARNip se enfrentan a varios retos relacionados con el suministro en las células y la estabilidad enzimática. Para abordar estos problemas, se prefieren las nanopartículas para proteger y encapsular el ARNip. En la bibliografía se han descrito numerosos vehículos para lograr la captación y transfección de células con ARNip. [6] Sin embargo, los únicos fármacos de ARNip aprobados clínicamente se dirigen al hígado, y el suministro pulmonar aún está en el futuro. [7, 8]

[0003] Los polímeros catiónicos son una clase de nanoportadores de ácidos nucleicos entre los que la polietilimina (PEI) es el más estudiado. Sin embargo, el uso de PEI es limitado debido a su perfil de citotoxicidad. Para superar las características tóxicas de la PEI, el solicitante ha desarrollado copolímeros de PEI con mejores perfiles de seguridad. Estos copolímeros combinan la eficacia de condensación y protección de los ácidos nucleicos de la PEI, pero también los efectos de transfección y estabilidad de la policaprolactona (PCL) y el polietilenglicol (PEG), respectivamente. Se demostró que estos copolímeros de PEG-PCL-PEI (PPP) o de polietilimina conjugada con transferrina (Tf-PEI) pueden formar los denominados poliplejos con ácidos nucleicos en la nanoescala mediante interacción electrostática y transfectar con éxito células *in vitro* e *in vivo* [9-11]. Para suministrar estas nanopartículas al pulmón, se requiere la incorporación en micropartículas con diámetros aerodinámicos de entre 1 y 5 µm. Las matrices de estas micropartículas deben consistir en excipientes que se disuelvan fácilmente al impactar en el líquido de revestimiento pulmonar y liberen su nanocarga. [12] Por consiguiente, se requiere el uso de sustancias hidrosolubles.

[0004] Las nanopartículas lipídicas son una clase diferente de nanoportadores. La nano-en-microencapsulación de ARNip basada en nanopartículas lipídicas es especialmente interesante, ya que estos sistemas portadores han recibido recientemente un salto en popularidad debido a los avances resultantes del desarrollo de las vacunas contra el COVID 19. Adicionalmente, las nanopartículas lipídicas tienen la ventaja de que tienen una estructura bien definida, tanto en el interior como en la superficie. Además, presentan monodispersidad. Estas características son ventajosas en varios sentidos, especialmente si se tienen en cuenta los requisitos de los ensayos clínicos y los procesos de aprobación. Finalmente, el uso de nanopartículas lipídicas como portador es ventajoso porque, con la sustancia Onpattro® ya clínicamente aprobada y la respectiva formulación Onpattro® disponible, se espera que los enfoques que hacen uso de Onpattro® y sus derivados reciban la aprobación clínica de forma más conveniente.

[0005] Una técnica conocida para producir tales nano-en-micropartículas (NIM) es el secado por pulverización. Es un método ampliamente aplicado en la industria de los alimentos, cosmética, química y farmacéutica y permite el secado suave de pequeñas gotas. [13] Además, es mucho más rápido y consume menos tiempo y energía que la liofilización por pulverización, que también se usa para la producción de formulaciones terapéuticas de polvo seco inhalable de ARNip. [14] Sin embargo, ya que el secado por pulverización aplica calor a las muestras, el proceso podría degradar o inactivar el ARNip y/o el nanoportador de ácido nucleico, tal como PPP o Tf-PEI. [12] Como la cantidad absoluta y relativa de ARNip bioactivo en una formulación de polvo seco y su reproducción fiable, en particular, en aplicaciones a gran escala, es un parámetro crítico no solo con respecto al proceso de aprobación farmacéutica, sino también con respecto a la producción económica de tales polvos secos y composiciones farmacéuticas, es importante establecer un proceso de secado por pulverización y un polvo seco resultante, que presente las propiedades geométricas deseadas de tamaño y distribución de partículas con un porcentaje elevado y fiable de ARNip encapsulado y bioactivo con éxito.

[0006] Para una nano-en-microencapsulación del ARNm a base de nanopartículas lipídicas, anteriormente, el uso del secado por pulverización solo tenía éxito si antes del secado por pulverización se llevaba a cabo una encapsulación o estabilización adicional con un polímero o poliplejo, como describe el documento US 2020/00022921 A1. Sin embargo, el uso de poliplejos o polímeros adicionales a las nanopartículas lipídicas no solo complica el método, sino

que también dificulta su aprobación clínica.

[0007] Por lo tanto, el objetivo de la invención es sugerir un método para producir un polvo seco que comprenda ARNip nano-en-microencapsulado bioactivo con alta cantidad e integridad, que dé lugar a un alto grado de redispersabilidad de las nanopartículas de ARNip.

[0008] Este problema se resuelve mediante un método de acuerdo con la reivindicación independiente 1 para producir polvo seco de ARNip nano-en-microencapsulado (NIM) bioactivo de alto rendimiento que comprende las etapas de:

- proporcionar una suspensión acuosa que comprende poliplejos, en particular, complejos de polielectrolitos, formados por al menos una poliamina, poliamida y/o poliéster y ARNip, en donde los poliplejos se encapsulan en excipientes hidrosolubles, en particular, agua altamente purificada y/o alditol y/o azúcar, o proporcionar una suspensión acuosa que comprenda nanopartículas lipídicas, en particular, la formulación Onpattro®, formada por al menos un lípido catiónico ionizable, un lípido auxiliar, un lípido pegilado, colesterol y ARNip, en donde las nanopartículas lipídicas están provistas de y/o encapsuladas en excipientes hidrosolubles, en particular, agua altamente purificada y/o alditol y/o azúcar;
- secar por pulverización la suspensión acuosa usando un aparato de secado por pulverización, preferentemente un Büchi B-290, alimentando la suspensión acuosa a una boquilla atomizadora de secado por pulverización y sometiendo las gotitas atomizadas a una corriente de gas calentado de un gas portador, preferentemente aire seco y limpio, en particular, a través de una boquilla atomizadora multicomponente tanto para la suspensión como para el gas y el gas atomizador;
- recoger un polvo secado por pulverización en unos medios de acumulación del aparato de secado por pulverización, caracterizado por que la temperatura en las proximidades de una abertura de salida del aparato de secado por pulverización, en particular, una abertura de salida que conecta una cámara de secado por pulverización con el medio de acumulación, durante la alimentación de la suspensión acuosa a la boquilla se controla mediante medios de control de la temperatura para que se limite a una temperatura umbral superior que sea igual o inferior a una temperatura de fusión del ARNip no marcado.

[0009] La idea básica de la invención se basa en la cuantificación del ARNip tras la redispersión de nanopartículas de polímero y/o lípidos después del secado por pulverización en función de los parámetros de secado por pulverización, especialmente el control de la temperatura de salida, y en la conservación de las características de las nanopartículas de los materiales secados por pulverización. Se descubrió que la temperatura de salida desempeña un papel importante para reducir la pérdida de ARNip bioactivo aunque la temperatura de entrada, que también puede monitorearse y que normalmente es la temperatura que se limita para controlar de este modo la temperatura de salida, sea significativamente más alta.

[0010] Sorprendentemente, las temperaturas de salida que estaban por encima de las temperaturas para las que se conocía que el ARNip no marcado respectivo se fundía, condujeron a una pérdida significativamente mayor de ARNip bioactivo o funcional tras el secado por pulverización y a una posible redispersión en comparación con los resultados obtenidos mediante el uso de temperaturas de salida más bajas. La temperatura de salida es, como regla general, similar o ligeramente superior a la temperatura a la que se calienta un polvo o una solución/suspensión seca durante los procesos conocidos de secado por pulverización. Sin embargo, es sorprendente que, incluso cuando se combina con una poliamida y/o poliamina y/o poliéster y/o nanopartículas lipídicas y se encapsula en una matriz de excipientes hidrosolubles, el ARNip no se protege térmicamente ni se estabiliza químicamente durante el secado por pulverización en un grado significativo o mensurable, reflejándose en una temperatura de salida superior a la temperatura de fusión del ARNip no marcado que no conduciría a pérdidas significativamente mayores de ARNip bioactivo tras el secado por pulverización. Es especialmente ventajoso que, mediante el método inventivo, se generaran composiciones de polvo seco que presentan las distribuciones de tamaño de partícula que son necesarias para su uso farmacéutico, especialmente el suministro pulmonar.

[0011] Incluso más sorprendentemente, el método inventivo hizo posible el secado por pulverización de un polvo seco de ARNip nano-en-microencapsulado (NIM) bioactivo basado en nanopartículas lipídicas mediante secado por pulverización sin la encapsulación o estabilización adicional del sistema o suspensión por un polímero o poliplejo adicional como se ha divulgado en el documento US 2020/00022921 A1. En otras palabras, esto significa que la etapa del método consistente en proporcionar una suspensión acuosa que comprende nanopartículas lipídicas no incluye explícitamente la adición de un polímero o un poliplejo a la suspensión.

[0012] Son numerosas las ventajas del método inventivo para el polvo seco de ARNip nano-en-microencapsulado (NIM) bioactivo basado en una suspensión acuosa que comprende nanopartículas lipídicas. Las nanopartículas lipídicas permiten encapsular física y/o geoméricamente el ARNip, haciendo que la protección del ARNip sea más eficaz. Adicionalmente, la monodispersidad y las formulaciones aprobadas de las nanopartículas lipídicas permiten una aprobación clínica más fácil de fármacos similares de ARNip. En conjunto, el sistema portador de nanopartículas lipídicas permite un sistema muy bien definido para el polvo seco de ARNip nano-en-microencapsulado (NIM) bioactivo.

5 [0013] Puede usarse tanto manitol como alditol. Pero otros alditoles son candidatos igualmente adecuados. Pueden usarse trehalosa y/o lactosa como azúcar. También se pueden usar otros azúcares. Como se describe a continuación, actualmente, ciertos azúcares y alditoles parecen ser candidatos prometedores para los enfoques de nanopartículas poliméricas y lipídicas, respectivamente. Sin embargo, se están investigando otros excipientes hidrosolubles con diferentes azúcares y/o alditoles o diferentes composiciones.

10 [0014] Es una realización ventajosa de la invención controlar la temperatura en las proximidades de una abertura de salida del aparato de secado por pulverización o la temperatura de salida o la temperatura umbral superior a un valor que está en un intervalo de 5 °C, en particular, en el intervalo de 3 °C, inferior a/por debajo de la temperatura de fusión del ARNip no marcado respectivo.

15 [0015] De acuerdo con otra realización ventajosa de la invención, la temperatura umbral superior o temperatura de salida se fija en 90 °C, en particular, 80 °C. Para diferentes secuencias de ARNip, esta es una temperatura que permite un alto rendimiento de ARNip bioactivo al mismo tiempo que se alcanza la humedad residual baja y un tamaño de partícula y una distribución de tamaño deseados del polvo seco. Esta temperatura umbral superior de salida es especialmente ventajosa para las suspensiones acuosas que comprenden poliplejos.

20 [0016] En una realización adicional de la invención, la temperatura umbral superior de salida se limita a 63 ± 2 °C, preferentemente a 51 ± 2 °C, especialmente a 41 ± 2 °C. Estas temperaturas umbrales superiores de salida son especialmente ventajosas si se seca por pulverización una suspensión acuosa que comprende nanopartículas lipídicas. Sorprendentemente, la humedad residual tras el secado por pulverización a temperaturas de salida tan bajas era lo suficientemente baja como para formar un polvo seco estable con un período de validez aceptable.

25 [0017] De acuerdo con una realización ventajosa adicional de la invención, la proporción en masa entre el ARNip y un azúcar y/o alditol está entre el 0,001 % y el 0,02 %, en particular, para la suspensión acuosa que comprende nanopartículas lipídicas. La proporción en masa del ARNip respecto a un azúcar y/o alditol es importante al menos por dos razones. Por un lado, es deseable una proporción alta para que la cantidad (especialmente masa y volumen) del polvo seco resultante que tiene incorporada o contiene una cierta cantidad de ARNip activo sea baja. Esto es deseable no solo desde el punto de vista de la producción, sino también desde el punto de vista médico o farmacéutico, ya que, cuanto menor sea la proporción del ARNip con respecto a un azúcar y/o alditol, mayor será la dosis de polvo seco que se va a administrar o redispersar del polvo seco para administración. Por otro lado, la investigación que ha conducido a la presente invención parece indicar que la proporción del ARNip con respecto a un azúcar y/o alditol en la suspensión acuosa parece tener un efecto hasta ahora desconocido o inexplicable sobre la capacidad del método inventivo para producir un polvo seco con una cantidad o porcentaje elevado de ARNip activo.

35 [0018] Especialmente para una suspensión acuosa que comprende nanopartículas lipídicas, la proporción o intervalo de dicha proporción identificada anteriormente ha permitido sorprendentemente el éxito del secado por pulverización sin necesidad de encapsular más las nanopartículas lipídicas con polímeros o poliplejos, lo que hace que el método resulte muy atractivo para aplicaciones industriales y a gran escala, ya que, sin necesidad de estabilización adicional mediante poliplejos o polímeros, el método puede ejecutarse más fácilmente y se beneficia aún más de la naturaleza bien definida de las nanopartículas lipídicas en contraste con la naturaleza menos definida de los poliplejos y los polímeros. Adicionalmente, la formulación puede mantenerse simple para un proceso de aprobación sencillo, y el uso de excipientes puede reducirse.

45 [0019] En una realización útil adicional de la invención, la suspensión acuosa se alimenta a la boquilla a través de un material de entubación poco abrasivo, en particular, un material de entubación a base de silicio poco abrasivo, especialmente Pumpsil®. Sorprendentemente, se descubrió que el material de entubación tiene un efecto significativo sobre la cantidad o el porcentaje de ARNip bioactivo en el polvo seco por pulverización. En particular, si la temperatura se controla como se ha indicado anteriormente y la suspensión acuosa se alimenta a la boquilla a través de un material de entubación poco abrasivo, las pérdidas de ARNip pueden reducirse a menos del 10 % del contenido de ARNip, es decir, menos del 10 % de la masa del ARNip original usado, especialmente menos del 5 % del contenido o masa de ARNip. Es especialmente ventajoso que el material de entubación poco abrasivo no tenga ningún efecto negativo sobre el método de secado por pulverización y el polvo seco resultante.

50 [0020] De acuerdo con una realización ventajosa adicional, el secado por pulverización se realiza usando un gas atomizador que se alimenta a la boquilla atomizadora, preferentemente nitrógeno, y un gas portador calentado, preferentemente aire seco, que se alimenta a una cámara de secado por pulverización del aparato de secado por pulverización. Estos gases pueden filtrarse para eliminar el polvo y las partículas antes de alimentarlos a la boquilla atomizadora o a la cámara de secado por pulverización, respectivamente.

55 [0021] En una realización adicional de la invención se lleva a cabo una etapa de secado adicional, en la que se alimenta un gas portador a través del aparato de secado por pulverización, especialmente la boquilla atomizadora, sin ser mezclado con solución o suspensión acuosa y preferentemente mientras el polvo seco por pulverización ya se ha transferido al medio de acumulación. Aunque es ventajoso suministrar el gas portador al aparato de secado por pulverización de la misma manera que durante el proceso de secado por pulverización propiamente dicho, porque no es necesario adaptar el proceso y el aparato para realizar la respectiva etapa del proceso, el gas portador para la

etapa de secado adicional también puede alimentarse a través del polvo secado por pulverización por diferentes medios, por ejemplo, una boquilla independiente o similares.

5 **[0022]** La etapa adicional de secado o la etapa adicional de secado por pulverización reduce la humedad residual sin dañar los poliplejos y/o el ARNip y de este modo aumenta la fracción de partículas finas (FPF) del polvo. Esto también es ventajoso para el suministro a las células y la resuspensión de los poliplejos y/o nanopartículas lipídicas.

10 **[0023]** La etapa de secado adicional es especialmente útil para el secado por pulverización de suspensiones acuosas que comprenden nanopartículas lipídicas. Como se ha indicado anteriormente, las temperaturas umbral más bajas son ventajosas para esos sistemas. En consecuencia, la etapa de secado adicional puede ayudar especialmente a reducir la humedad residual de tales polvos, particularmente cuando se obtienen polvos amorfos.

15 **[0024]** En otra realización preferida, la etapa adicional de secado se lleva a cabo con la temperatura en las proximidades de la abertura de salida controlada por medios de control de la temperatura para ajustarse a una temperatura umbral superior, en particular, una temperatura umbral superior que sea igual o inferior a una temperatura de fusión del ARNip no marcado, especialmente dentro de un intervalo de 5 °C, en particular, en el intervalo de 3 °C, por debajo de la temperatura de fusión del ARNip no marcado respectivo. En otras palabras, la etapa de secado adicional puede llevarse a cabo a la misma temperatura que el secado por pulverización propiamente dicho. Tal circunstancia es especialmente ventajosa ya que reduce la cantidad de variables de proceso o parámetros de método del método de secado por pulverización. Por tanto, la etapa de secado adicional puede llevarse a cabo manteniendo el gas portador en funcionamiento durante un período de tiempo adicional después de que la suspensión acuosa haya sido alimentada por la boquilla de atomización, en particular, sin alterar la temperatura del gas portador. En una realización preferida, el flujo volumétrico del gas portador también permanece inalterado durante la etapa de secado adicional. La etapa de secado adicional puede tener lugar directamente después del secado por pulverización de la suspensión acuosa que contiene el ARNip. Como alternativa, el secado por pulverización puede comprender también una etapa de método, en la que, tras el secado por pulverización de la suspensión acuosa, se fabrica una solución o suspensión intermedia, tal como agua exenta de ribonucleasa, en particular, durante un período de 1 a 5 minutos, antes de realizar la etapa de secado adicional.

20 **[0025]** Se prefiere además que la etapa de secado adicional se lleve a cabo hasta alcanzar una humedad residual inferior al 3 %, en particular, inferior al 2 %. Esto prolonga el período de validez del polvo seco resultante.

25 **[0026]** Se comprobó además que el ARNip se conservaba en un estado bioactivo muy elevado durante la etapa de secado adicional, cuando se usó polietilenimina-injerto-policaprolactona-bloque-polietilenglicol (PEI-g-PCL-b-PEG o PPP) y/o un bioconjugado de polietilenimina con péptidos o proteínas tales como la polietilenimina conjugada con transferrina (Tf-PEI) como poliamina. Esto resulta especialmente ventajoso, porque la Tf-PEI es una poliamida que es muy prometedora para dirigirse a los linfocitos T con el respectivo polvo seco. La PPP es ventajosa por su baja citotoxicidad.

30 **[0027]** En una realización ventajosa del método para secar por pulverización una suspensión acuosa que comprende nanopartículas lipídicas, el lípido catiónico ionizable era un lípido similar al MC3.

35 **[0028]** En otra realización, los lípidos auxiliares se eligieron del siguiente grupo de lípidos: 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC), 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) y 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DSPG). Se usaron para permitir la formación de sistemas de NPL-ARNip con potencial zeta casi neutro, positivo y negativo, respectivamente.

[0029] En otra realización ventajosa, el lípido pegilado puede ser PEG-DMG.

40 **[0030]** El objetivo anterior también se consigue mediante un polvo que contiene ARNip bioactivo en forma de poliplejos, en particular, complejos de polielectrolitos, formados por al menos una poliamina y/o poliamida y/o poliéster y ARNip o en forma de nanopartículas lipídicas formadas de al menos un lípido catiónico ionizable, un lípido auxiliar, un lípido pegilado, colesterol y ARNip, en donde los poliplejos se encapsulan en excipientes hidrosolubles, en particular, manitol y/o trehalosa y/o lactosa, preferentemente con diámetros aerodinámicos (MMAD, *mass median aerodynamic diameter*) entre 0,5 y 10 µm, en particular, 1 y 5 µm, en donde el polvo se produce de acuerdo con el método descrito anteriormente.

45 **[0031]** Para el polvo seco que contiene ARNip bioactivo en forma de nanopartículas lipídicas formadas desde al menos un lípido catiónico ionizable, un lípido auxiliar, un lípido pegilado, colesterol y ARNip, cabe mencionar que este polvo no incluye un polímero o poliplejo, ya que el polvo seco se seca por pulverización sin dichos poliplejos o polímeros.

50 **[0032]** Para el polvo seco que contiene ARNip bioactivo en forma de nanopartículas lipídicas formadas desde al menos un lípido catiónico ionizable, un lípido auxiliar, un lípido pegilado, colesterol y ARNip, la proporción en masa entre el ARNip y azúcar y/o alditol está preferentemente entre el 0,001 % y el 0,02 %. Preferentemente, la proporción en masa es de al menos el 0,004 %, especialmente al menos el 0,01 %.

[0033] De acuerdo con una realización preferida de la invención, el polvo puede resuspenderse en agua para obtener poliplejos o suspensiones de poliplejos o nanopartículas lipídicas o suspensiones de nanopartículas lipídicas que no sean significativamente diferentes, en particular, que no varíen más de +/- 10 %, de su formulación inicial antes del secado por pulverización con respecto al tamaño, polidispersidad y potencial zeta. Esta realización permite una absorción eficaz del polvo en las células. Por tanto, el polvo inventivo no presenta aglomerados significativos tras la resuspensión que disminuyan el porcentaje de poliplejos potencialmente absorbibles por las células.

[0034] El polvo inventivo permite un período de validez largo debido a la baja humedad residual. Más aún, el polvo comprende una cantidad elevada o un rendimiento elevado del ARNip inicialmente proporcionado en estado bioactivo, permitiendo de este modo una producción eficaz de ARNip en polvo. Ya que el contenido de ARNip bioactivo es reproducible, el polvo es una excelente plataforma para el proceso de registro farmacéutico de fármacos basados en ácidos nucleicos.

[0035] De acuerdo con una realización preferida, la poliamina de los poliplejos encapsulados es polietilenoimina-injerto-policaprolactona-bloque-poli(etilenglicol) (PEI-g-PCL-b-PEG o PPP) y/o bioconjugados de polietilenoimina o poliespermina con péptidos o proteínas tales como la polietilenoimina conjugada con transferrina (Tf-PEI). Estas poliaminas son candidatas prometedoras para un uso farmacéutico del polvo seco.

[0036] En una realización preferida, las partículas presentan una estructura esférica.

[0037] El objetivo anterior también se logra mediante el uso de una composición o mezcla en polvo que comprende al menos un polvo divulgado anteriormente como forma de dosis farmacéutica, en particular, para el suministro pulmonar. A este respecto, es especialmente ventajoso que el proceso de secado por pulverización dé como resultado un tamaño de partícula y una distribución de tamaño adecuados para el suministro pulmonar.

[0038] El objetivo anterior también se consigue mediante un uso de una composición en polvo o mezcla que comprende al menos un polvo divulgado anteriormente en donde el ARNip es activo para silenciar la traducción del ARN mensajero en proteínas causantes de enfermedades pulmonares.

[0039] Las realizaciones inventivas y comparativas no inventivas se describirán con más detalle a continuación. Las realizaciones inventivas son solo ejemplos especiales de la divulgación técnica:

Materiales y métodos

[0040] Ejemplos y realizaciones a base de suspensiones acuosas que comprenden poliplejos: El ARNip bicatenario dirigido a la proteína verde fluorescente (DsiRNA EGFP 1, *Double stranded siRNA targeting green fluorescent protein*) (siGFP) y el control inespecífico desordenado (siNC, *scrambled nonspecific control*) son comercializados por IDT (Integrated DNA Technologies, Inc., Leuven, Bélgica). La invención se describirá con más detalle con respecto a esos especímenes de ARNip. Sin embargo, la invención no se limita al uso de tal ARNip. Pueden usarse otros ARNip, especialmente para usos farmacéuticos.

[0041] La polietilenoimina (PEI) hiperramificada (25 kDa) es comercializada por BASF (Ludwigshafen, Alemania). El poli(etilenglicol) heterobifuncional (HO-PEG-COOH, 2,5 kDa) es producido por JenKem Technologies (Plano, TX, EE. UU.). La ϵ -caprolactona, heparina de mucosa intestinal porcina (H3393, >180 unidades/mg, grado I-A), ácido picrilisulfónico (TNBS) (P2297), solución tampón TRIS EDTA 1x (tampón TE) (93283), solución tampón TRIS EDTA 100x para análisis NGL (T9285), tampón tris borato EDTA (tampón TBE) (T 3913), medio RPMI-1640 (R8758), suero fetal bovino (FBS) (F9665), penicilina-estreptomicina (P/S) (P4333), solución salina de disulfato G 418 (G8168), solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco (PBS) (D8537) y D-manitol están disponibles a través de Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). La D(+)-trehalosa dihidratada (28719.290) se adquirió de VWR International GmbH (Darmstadt, Alemania). Las placas de 96 pocillos blancas y negras (10307451), escala de ADN de rango ultrabajo GeneRuler (10400280), tinción de geles de ADN y geles de poli(acrilamida) SYBR™ Safe™ (geles Novex™ TBE, 4-20 %, EC62252BOX) son comercializados por Fisher Scientific (Schwerte, Alemania). El colorante SYBR™ Gold se obtuvo de Life Technologies (Carlsbad, CA, EE. UU.). Se usaron tubos Pumpsil® de Watson-Marlow GmbH (Rommerskirchen, Alemania) que tienen un diámetro interior y un grosor de 1,6 mm.

Síntesis de poliaminas

[0042] La síntesis de la poliamina polietilenoimina-injerto-policaprolactona-bloque-poli(etilenglicol) (PEI-g-PCL-b-PEG o PPP) puede realizarse como se ha descrito anteriormente. [24] Este documento, así como los documentos EP 3 277 743 A4 y WO 2008 151 150 A2 se incorporan por referencia como parte de la presente divulgación. En resumen, se sintetizó el copolímero tribloque de polietilenoimina-*injerto*-policaprolactona-*bloque*-poli(etilenglicol) (PEI-g-PCL-b-PEG) (PPP) acoplado el copolímero dibloque heterobifuncional acrilado-PCL-b-PEG-alquino al PEI. La caracterización se realizó mediante RMN de ¹H y espectroscopia UV como se describió anteriormente [10].

[0043] La polietilenoimina conjugada con transferrina (Tf-PEI) se sintetizó de acuerdo con la divulgación de [24a], así

como con el documento US 2002 013 767 0 A1, también incorporados por referencia en el presente documento.

[0044] Pueden incorporarse otras poliaminas posibles a los poli(uretanos), poli(ureas), poli(acrilamidas), poli(amidas), poli(ésteres) o poli(aminoésteres). La espermina es una poliamina biogénica, que consiste en dos aminas primarias y dos secundarias, encontrada como un policatión en todos los valores de pH. Las poli(acrilamidas a base de espermina pueden sintetizarse a través de polimerización por radicales libres o radicales vivos (p. ej. RAFT) del (met)acrilato de un éster activo del ácido acrílico y postpolimerización con una especie de espermina o directamente a través de polimerización de una acrilamida consistente en espermina. Se prefieren tales poliaminas, ya que son biodegradables y biocompatibles.

Preparación de poliplejos

[0045] Se prepararon soluciones madre de siGFP y PPP con una concentración de 100 µM y 1 mg/ml, respectivamente. Se prepararon poliplejos con una cantidad total de 30 µg de siGFP. Por lo tanto, la cantidad de PPP (m_{PEI}) en µg se calculó de la siguiente manera:

$$m_{PPP} = \left(\frac{m_{siGFP}}{17950,36 \text{ g/mol}} \right) 43,1 \cdot N/P \text{ (Ec. 1)}$$

[0046] La cantidad calculada de PPP se diluyó hasta 250 µl en un disolvente específico (agua altamente purificada (AAP)), trehalosa o manitol al 5 o 10 %) y se añadieron 250 µl del mismo disolvente que contenía 30 µg de siGFP. Para permitir la formación de poliplejos, la mezcla se incubó durante 10 minutos. Entonces, se añadieron 4500 µl del mismo disolvente especificado y la suspensión de poliplejo se incubó durante otros 10 minutos.

Adsorción al material del tubo

[0047] Para reducir la adsorción de los poliplejos por el material de entubación durante el bombeo a través de la tubería respectiva, los diferentes materiales de tubo se lavaron antes de los experimentos con HPW precalentado y se dejaron secar. Tras la inserción en el Masterflex L/S (7520-47, Cole-Parmer GmbH, Wertheim, Alemania), equipado con el módulo del cabezal Easy-Load II (77201-60), se fijó una velocidad de bombeo de 1,2-1,4 ml/min. Los poliplejos se prepararon en AAP y se bombearon a través de la tubería y se recogieron en un tubo de 5 ml para su posterior análisis. Este procedimiento se llevó a cabo por triplicado.

Secado por pulverización

[0048] Para la preparación de micropartículas se usó un equipo B-290 (Büchi Labortechnik, Essen, Alemania) como aparato de secado por pulverización. Como los tubos Pumpsil® no encajaban en la bomba Büchi preinstalada, se usó el Masterflex L/S (véase anteriormente) con una velocidad de bombeo de 1,2-1,4 ml/min. Se usó nitrógeno como gas de atomización, mientras que el gas portador era aire. Para evitar el polvo y otras partículas suspendidas en el aire, tanto el suministro de nitrógeno como el de aire se filtraron a través de un filtro de poros de 0,22 µm. Para garantizar un calentamiento suficiente del suministro de aire y evitar el sobrecalentamiento de la bomba de vacío Büchi, se usó aire a presión. El aspirador se ajustó al 70 % y el vacío se ajustó a -4 kPa (-40 mbar) ajustando el nivel de aire presurizado. El caudal de aire se fijó en 40 mm, lo que corresponde a 473 NI/h. Para la recogida de partículas, se acopló un ciclón de alta eficacia a una abertura de salida del aparato de secado por pulverización. Los poliplejos se prepararon en trehalosa o manitol al 5 o al 10 % m/V.

[0049] Todas las formulaciones se prepararon el mismo día para evitar diferencias interdiarias relacionadas con la temperatura y la humedad ambiente, por ejemplo. Para el análisis se produjeron tres lotes en tres días diferentes. En el caso de diferentes temperaturas de entrada (T-En.), las temperaturas de salida (T-Sal.) medidas se indicaron junto a T-En. para una mejor comprensión del proceso. Durante el proceso de secado por pulverización, se observaron cambios menores de la T-Sal. Por consiguiente, La T-Sal. se informó como la media con una desviación de ± 1,5 °C.

Etapas de secado adicional

[0050] Para una ejecución de secado por pulverización, se diluye una cantidad total de 30,00 µg de siGFP con una solución de trehalosa al 5 % en agua exenta de ribonucleasa hasta un volumen total de 250 µl. Los poliplejos se preparan con un cociente de N/P de 10. Por lo tanto, se diluye también la cantidad necesaria de PPP [1] con una solución de trehalosa al 5 % en agua exenta de ribonucleasa hasta un volumen de 250 µl. La solución de PPP se añade a la solución de siGFP y se pipetea enérgicamente arriba y abajo. Se incuba durante 20 minutos para la formación de poliplejos. Posteriormente, se añaden 4500 µl de solución de trehalosa al 5 % a la suspensión de poliplejo. Se gira el tubo con cuidado para mezclar. Al mismo tiempo, el secador de pulverización está encendido; los parámetros se ajustan a una temperatura de entrada de 145 °C, aspirador al 70 %, un caudal de aire de 40 mm (473 NI/h) y refrigeración por agua de la boquilla. El agua exenta de ribonucleasa se seca por pulverización a 1,4 ml/min. Si se alcanza una temperatura de entrada constante de 145 °C, se inicia el proceso de secado por pulverización con la dispersión de poliplejo-trehalosa. Al final del proceso, el tubo de muestra se sustituye por agua exenta de ribonucleasa que se seca por pulverización durante otros 2 minutos. En lo sucesivo en el presente

documento, la bomba se detiene. El proceso de secado por pulverización finaliza y se inicia adicionalmente la etapa de secado por pulverización de las micropartículas nanoincorporadas. Se fija un temporizador de cinco minutos y se mantienen constantes todos los demás parámetros. Por lo tanto, la etapa posterior de secado tiene lugar a 145 °C de temperatura de entrada. Finalmente, se detiene el proceso de secado por pulverización y se recoge el polvo secado por pulverización.

[0051] Después del proceso de secado, se recoge todo el polvo, se pesa y se usan alícuotas para análisis posteriores. Para cuantificar el contenido de PPP y siGFP dentro del polvo de micropartículas tras el secado por pulverización, se disolvió una alícuota del polvo en AAP (agua altamente purificada), y se realizaron ensayos de competencia con heparina para disociar los poliplejos siGFP-PPP dentro del polvo de NIM. Posteriormente, la siGFP liberada de los poliplejos se determinó mediante un ensayo SYBR@ gold modificado [1], mientras que la concentración de PPP se determinó mediante un ensayo TNBS [2].

[0052] En primer lugar, el lote de polvo de NIM se disolvió en 2 ml de AAP en un matraz volumétrico. El siguiente procedimiento se ejecutó por triplicado: Según el contenido teórico de siGFP, se eligió un volumen para conseguir aproximadamente 0,04 µg de siGFP por muestra. Esta solución se diluyó hasta un volumen final de 150 µl por muestra con AAP en un tubo. Después, se añadieron 75 µl de una solución de 58 k UI de heparina a cada tubo para lograr la disociación completa de los poliplejos al cabo de 2 h. Esta solución se diluyó de nuevo hasta 450 µl y se distribuyó en una placa blanca de 96 pocillos (placa de micropocillos Thermo Scientific™ BioLite, Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Alemania) por triplicado de 100 µl cada uno. Para la cuantificación de siGFP, se añadieron 30 µl de una solución de 4 × SYBR@ gold a cada pocillo y se incubaron durante 10 min en la oscuridad a temperatura ambiente. La fluorescencia de cada muestra se cuantificó usando un lector de microplacas multimodo Synergy 2 (BioTek Instrument, Winooski, VT, EE. UU.) a una longitud de onda de excitación de 485/20 nm y una longitud de onda de emisión de 520/20 nm y se comparó con una curva patrón recién preparada de siGFP libre incubada con colorante SYBR@ gold.

[0053] Para la cuantificación de la PPP, 100 µl de solución disuelta de cada lote en 2 ml de tampón de bórax a 0,1 M (bórax de sodio decahidratado, Sigma Aldrich, Alemania) se incubaron con 30 µl de solución de TNBS a 3 mM por triplicado y se determinó la absorbancia a 405 nm tras 1 h de incubación usando un lector de microplacas multimodo Synergy 2 (BioTek Instrument, Winooski, VT, EE. UU.). La absorbancia medida se comparó con una curva patrón recién preparada de PPP libre incubada con reactivo TNBS. Para verificar cada ensayo de cuantificación, se prepararon nuevos patrones internos y se analizaron en paralelo. Estos patrones consistían en siGFP y PPP de cantidades conocidas que se elegían según la cantidad teórica de siGFP o PPP que se analizaba en la muestra, respectivamente. Estos fueron de 0,04 µg de siGFP por pocillo para la cuantificación del ácido nucleico y de 0,48 a 1,2 µg de PPP para la cuantificación del polímero. Las mediciones con desviaciones inferiores al 10 % del patrón interno se consideraron igualmente precisas y se tuvieron en cuenta para análisis posteriores.

[0054] El contenido de agua residual del polvo de NIM tras el secado por pulverización se determinó mediante medición coulombimétrica usando un titulador de Karl Fischer Aqua 40.00 con el *software* correspondiente de Analytik Jena AG (Jena, Alemania). Las muestras (aprox. 15 mg) se cargaron en viales 2R, se colocaron en la cámara de calentamiento y se midieron a 100 °C hasta que la deriva de medición alcanzó la deriva inicial $\leq +2$ µg/min o hasta un tiempo de medición final de 10 min. La deriva inicial se estableció tras aproximadamente 1 h de equilibrio mostrando una tasa inferior a 10 µg/min. Se usó Hydranal Coulomat AG (Riedel-deHaën, Seelze, Alemania) como reactivo. Antes de cada sesión, el valorador se calibró con un patrón de agua al 1 %. El contenido de humedad se calculó como el % en peso de agua en relación con el peso total de la muestra.

Mediciones del promedio de Z y del PDI

[0055] Para comparar los efectos del bombeo y del secado por pulverización sobre el contenido de poliplejo, se compararon 70 µl de suspensión de poliplejo recién preparada con los poliplejos después de su procesamiento posterior. Para los experimentos de adsorción de la bomba, se tomaron 70 µl después del bombeo. Para la redispersabilidad de las formulaciones secadas por pulverización, se disolvieron aproximadamente 3,5 mg y 7,0 mg para las formulaciones de matriz al 5 % y al 10 %, respectivamente, en 70 µl de AAP. Todas las muestras se analizaron en cubetas desechables (Brand GmbH, Wertheim, Alemania) y se analizaron con el Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc., Malvern, Reino Unido). Por lo tanto, se ajustó el índice de refracción del agua, manitol o trehalosa a 25 °C para las concentraciones indicadas, y la detección se realizó con un ángulo de retrodispersión de 173°. Para cada experimento, se realizaron mediciones por triplicado con 15 ejecuciones cada una y se promediaron posteriormente.

Dispersión de luz estática

[0056] Se suspendieron unos pocos µg de polvo secado por pulverización en aproximadamente 2 ml de éter dietílico. Aproximadamente 30 minutos antes de las mediciones, se encendió el HORIBA LA-950 (Retsch Technology GmbH, Haan, Alemania) para equilibrio. La cubeta se llenó con éter dietílico, se insertó en el dispositivo y se registraron las mediciones de adquisición y en blanco. La suspensión de la muestra se mezcló a fondo pipeteando arriba y abajo y se añadieron pequeñas cantidades a la cubeta. Adicionalmente, se insertó una pequeña barra de agitación magnética para agitar la muestra. La velocidad se ajustó para conseguir una transmitancia de luz de entre el 85 y el 90 % de la

luz roja y de entre el 80 y el 90 % de la luz azul. La cantidad de polvo en la cubeta se ajustó en consecuencia. Para la medición se usaron los siguientes índices: Índice de refracción real - manitol: 1,330 Índice imaginario - manitol: 10,0 Índice de refracción real - trehalosa: 1,652 Índice imaginario - trehalosa: 2,0 Índice de refracción éter dietílico: 1,352

- 5 **[0057]** Los índices imaginarios se eligieron experimentalmente para obtener el parámetro R más pequeño posible (aquí $R < 0,08$ en todas las mediciones). La calidad de estas mediciones viene dada por el parámetro R, que disminuye si la dispersión prevista de las mediciones de la distribución granulométrica se ajusta a la dispersión detectada de la muestra. [25] Las mediciones se ejecutaron en tres lotes diferentes.

10 Microscopía electrónica de barrido

- [0058]** Se colocó una pequeña cantidad de polvo sobre un trozo cubierto con cinta de carbono de doble cara. Antes del análisis, el trozo se recubrió con carbono al vacío durante 40 s. La morfología de las partículas se examinó mediante microscopía electrónica de barrido (SEM, *scanning electron microscopy*) usando un FEI Helios G3 UC (Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Alemania).

Contenido de agua residual

- 20 **[0059]** Para micropartículas de trehalosa y manitol, se pesaron aproximadamente 5 mg y 15 mg en un vial 2R, respectivamente. Se midieron tres lotes diferentes por triplicado, cada uno. Además, se preparó un patrón de agua al 1 % con aproximadamente 10 mg. Después del llenado, se aplicó un pequeño trozo de lana cerámica (Analytik Jena AG, Jena, Alemania) por encima para evitar la succión de partículas a través del valorador. Los viales se cerraron con un tapón de plástico. Los viales vacíos que actuaban como valores en blanco se trataron en consecuencia. Para las mediciones coulombimétricas se usó un Valorador Karl Fischer Aqua 40.00 con el *software* correspondiente de Analytik Jena AG (Jena, Alemania). Primero se calentó el horno a 100 °C y se limpió el sistema de humedad residual introduciendo un vial vacío cerrado y activando la bomba hasta alcanzar una deriva final inferior a 8,0 µg/min. Se usó la deriva especificada y las condiciones de tope se fijaron en un tiempo total de medición de 10 minutos o hasta que la deriva alcanzó $\leq 2,0$ µg/min de la deriva inicial. Se realizaron mediciones en blanco que se sustrajeron automáticamente del patrón y de las muestras. Las mediciones se consideraron correctas si la medición del patrón de agua al 1 % daba como resultado un valor entre 0,9 y 1,1 %.

Calorimetría diferencial de barrido

- 35 **[0060]** Para las mediciones calorimétricas se pesaron de 3 a 5 mg de muestra en una bandeja cóncava y se cerró. La referencia era una bandeja cóncava vacía y cerrada. La referencia y la muestra se introdujeron en el horno a un punto de ajuste de 25 °C y se cerró el horno. Las mediciones se realizaron con un DSC 214 Polyma (Erich NETZSCH GmbH & Co. Holding KG, Selb, Alemania) a partir de -10 °C con una rampa de 8° K/min hasta alcanzar una temperatura de 160 °C para las formulaciones de trehalosa o de 200 °C para las de manitol. Los datos se analizaron con el *software* Proteus Analysis.

40

XRPD

- 45 **[0061]** Para la identificación de las estructuras cristalinas y/o amorfas se ejecutó XRPD con un difractor 3.000 TT (Seifert, Ahrensburg, Alemania). Equipado con un ánodo de cobre con una tensión de 40 kV y una corriente de 30 mA, se usó una longitud de onda de 0,154178 nm. El voltaje del detector de centelleo fue de 1.000 V. Las muestras colocadas en el portamuestras de cobre se analizaron en el intervalo de 5-40° 2-theta en pasos de 0,05° 2-theta.

Propiedades aerodinámicas

- 50 **[0062]** Para el análisis de las propiedades aerodinámicas se usó el aparato E de la Farmacopea Europea de Copley Scientific (Nottingham, Reino Unido). El impactador de nueva generación (NGI) estaba equipado con un preseparador (PS) y un puerto de inducción (IP). El instrumento se conectó a un controlador de flujo crítico (TPK 2, ERWEKA GmbH, Langen, Alemania) para garantizar la abertura correcta de la válvula durante un tiempo predeterminado para permitir el paso de un volumen total de 4 l de aire a través del instrumento para cada medición. Además de eso, el TPK se conectó a una bomba de vacío de alto rendimiento (HVP 1000, ERWEKA GmbH) que generaba un caudal que se fijó en 30 l/min (l volumétricos/min) mediante un caudalímetro TSI 4040 (TSI Instruments Ltd., High Wycombe, Reino Unido). Se preparó una solución madre de 0,167x Tris-EDTA (TE) mezclando 0,5 ml de 100x TE con 299,5 ml de AAP. Antes de cada análisis, el preseparador se llenó con 10 ml de solución de Heparina-TE (23,3 mg de Heparina en 60 ml de 0,167x TE) (HTE) y los vasos se recubrieron con 10 µl de una solución que contenía glicerina al 83 %, etanol al 14 % y Brij 35 al 3 %. [26] Se usaron bastoncillos de algodón previamente humedecidos con solución de recubrimiento para distribuir la solución de recubrimiento por toda la superficie del vaso. Para el análisis se cargaron 4 u 8 cápsulas de hidroxipropilmetilcelulosa con aproximadamente 45 mg de formulaciones atomizadas al 5 % o al 10 % m/V, respectivamente. Cada cápsula se cargó en un Handihaler® (Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim, Alemania) y se activó por perforación. De acuerdo con el manual del fabricante, las cápsulas se descargaron dos veces con un intervalo entre ambos accionamientos de 5 s. Tras descargar el contenido de las cápsulas en el impactador, se retiró cuidadosamente el IP y se cerró con dos tapones de goma después de introducir 10 ml de HTE.

65

Además, se retiró cuidadosamente el PS y se cerraron ambas aberturas con tapones de plástico. Ambos IP y PS, se agitaron vertical y horizontalmente durante 1 minuto. Finalmente, se desmontó el NGI y se llenaron los vasos pequeños con 2 ml de HTE, mientras que los vasos mayores se llenaron con 4 ml de HTE. Todos los vasos se cubrieron con una tapa de plástico para evitar la evaporación del disolvente. Los vasos se colocaron en un agitador durante 5 a 10 minutos y la velocidad de rotación se ajustó de forma que se evitara el derrame pero se garantizara la dispersión completa de las partículas. Se prepararon tres alícuotas de 100 µl de cada etapa, incluidas IP y PS, para su posterior análisis. La masa de siGFP depositada en cada etapa se analizó como se describe en el punto 2.12 con una línea de punto estándar extendida hacia el límite inferior. Este experimento se llevó a cabo con tres lotes diferentes. La mediana del diámetro aerodinámico de la masa (MMAD), la desviación estándar geométrica (DEG), la dosis de partículas finas (DPF) y la fracción de partículas finas (FPF) se calcularon como se describe en la Farmacopea Europea [19]. Se consideraron "partículas finas" todas las inferiores a 5 µm.

Cuantificación de ARNip y PPP

[0063] Los ensayos de cuantificación se realizaron como se ha descrito anteriormente. [12] En resumen, 50 mg para las formulaciones de matriz al 5 % y 100 mg para las formulaciones de matriz al 10 %, respectivamente, se transfirieron a un matraz aforado de 2 ml y se disolvieron en AAP para liberar los poliplejos. Estas soluciones se usaron para los siguientes ensayos:

Ensayo TNBS

[0064] Se tomó una alícuota de 100 µl de cada muestra y se mezcló con TNBS al 0,088 % m/v en bórax a 0,1 M. Tras un tiempo de incubación de 1 h, las muestras se analizaron con una cubeta de cuarzo en un espectrofotómetro UV-1600PC (VWR International GmbH, Darmstadt, Alemania) a una absorbancia de 405 nm. Los resultados se compararon con una serie de diluciones estándar igualmente tratadas (0,166 µg - 1,914 µg) a las que se añadió una cantidad correspondiente de siGFP para evitar sesgos. Las mediciones solo se tuvieron en cuenta para análisis posteriores si un patrón interno (Pi), preparado como se describe en el punto 2.3., mostraba una desviación inferior a ± 10 % con respecto a la cantidad teórica.

Ensayo de heparina SYBR gold (HepSYBR)

[0065] Se tomó una alícuota de 60 µl de cada muestra y se diluyó con AAP hasta 150 µl. Para disociar la siGFP de la PPP, se añadieron 75 µl de solución de heparina a 2,33 mg/ml en tampón TE y se incubaron durante 2 h. Tras diluir con AAP hasta 450 µl, se pipetearon triplicados de 100 µl en una placa negra de 96 pocillos. Se preparó una serie de diluciones a partir de 0,09 µg/100 µl y se añadió por triplicado en la misma placa negra de 96 pocillos. Para verificar la disociación completa de siGFP y PPP, se preparó un Pi como se describe en 2.3, se trató igual y se analizó por triplicado. Se preparó una solución 4x SYBR gold en AAP para la intercalación del ARN bicatenario y se añadieron 30 µl a cada pocillo con una multipipeta de 8 canales. La fluorescencia se midió a una longitud de onda de excitación de 485/20 nm y a una longitud de onda de emisión de 520/20 nm en un lector de microplacas multimodo FLUOstar® Omega (BMG LABTECH GmbH, Ortenberg, Alemania). Las mediciones se consideraron para análisis posteriores si el Pi mostraba una desviación inferior a ± 10 % en comparación con la cantidad teórica.

Prueba de integridad

[0066] Para conseguir una cantidad final de carga en gel de 150 ng de siGFP por carril ($m(\text{siGFP})_{\text{carril}}$), se consideraron las pérdidas de ARNip detectadas por HepSYBR (recuperación) y se usó el siguiente cálculo para determinar la cantidad de polvo secado por pulverización ($m(\text{NIM})$):

$$m(\text{NIM}) = m(\text{siGFP})_{\text{carril}} * \frac{m(\text{tsc})}{m(\text{siGFP})_{\text{de}}} * \text{recuperación} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde $m(\text{tsc})$ es el contenido sólido total del polvo secado por pulverización y $m(\text{siGFP})_{\text{sd}}$ es la cantidad inicial de siGFP usada para el secado por pulverización, es decir, 30 µg. Se pesó el polvo y se reconstituyó en 15 µl de AAP y 5 µl de Heparina (12 µg de Heparina / 5 µl de tampón TE). Después de 30 minutos de incubación, se añadieron 4 µl del colorante de carga 6x y se cargó un gel TBE al 4-20 % (EC62252BOX, ThermoScientific, Alemania) con 24 µl de cada muestra. Para el control, también se cargaron siGFP libre y siGFP con heparina. El gel se hizo correr a un voltaje constante de 200 V durante un máximo de 1 hora en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE) hasta que se separaron los carriles. Los geles se sacaron de la cámara y se colocaron en 20 ml de una solución 1x SYBRsafe durante 30 minutos bajo agitación a 50 rpm. Los geles se analizaron usando un detector de fluorescencia ChemiDoc (Bio-Rad Laboratories GmbH, Feldkirchen, Alemania).

Atenuación *in vitro*

[0067] Para el rendimiento de la atenuación *in vitro* se usó una línea de cáncer de pulmón no microcítico H1299 (ATCC CRL-5803) que expresaba de forma estable la proteína de fluorescencia verde mejorada (GFP). Las células se cultivaron en RPMI-1640 suplementado con FBS (10 %), P/S (1 %) y G418 (0,4 %) para la selección a 37 °C con

CO₂ al 5 %. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad de 2×10^5 células por pocillo y un volumen total de 500 μ l de medio. El día de la transfección, se sustituyó el medio por 400 μ l de medio fresco y se aplicaron 100 μ l de muestras para obtener una concentración final de 100 nM de siGFP o siNC. Se probaron diferentes formulaciones secadas por pulverización a distintas concentraciones y, teniendo en cuenta las pérdidas detectadas, hubo que ajustar la cantidad de polvo y, en consecuencia, de excipiente. Por lo tanto, las muestras dentro de un mismo grupo se trataron para que contuvieran cantidades iguales de excipiente, a fin de mejorar la comparabilidad. Después de 72h, se desechó el medio, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se recogieron. Después de centrifugar a 400 rcf durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó y el sedimento celular se resuspendió en PBS. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo (citómetro de enfoque acústico Attune®, Life Technologies) y se midió la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) usando una excitación de 488 nm y un conjunto de filtros de emisión de paso de banda de 530/30 nm (BL-1H). Las muestras se analizaron por triplicado para cada lote, con cada muestra separada por morfología basada en la dispersión hacia delante/hacia los lados para un conjunto de 10.000 células viables. Los triplicados de cada lote se resumieron generando el valor medio.

15 Formulación de Tf-PEI y GATA3

[0068] Se preparó transferrina-PEI (Tf-PEI) como se describe en [27, 28]. Para regular por disminución GATA3, se usaron dos secuencias diferentes de ARNip dirigidas a GATA3 (siGATA3) de QIAGEN GmbH (Hilden, Alemania) en una mezcla de 1:1 (HS_GATA3_8 - SI04212446, y HS_GATA3_9 - SI04364101).

[0069] La formulación se secó por pulverización como se describe en el capítulo 2.4. conteniendo 1760 pmol / 5 ml de trehalosa o manitol al 5 % v/v. El polvo se analizó de acuerdo con el capítulo 2.11. para garantizar las cantidades exactas de siGATA3 para la transfección.

[0070] Se ejecutó una transfección con linfocitos T CD4⁺ primarios que se aislaron de capas leucocitarias recién obtenidas (DRK, Berlín, Alemania). Las células se cultivaron en medio RPMI complementado con FBS al 10 %, P/S al 1 %, HEPES a 10 mM, piruvato sódico a 1 mM y 4500 mg/l de glucosa.

[0071] Para la atenuación de GATA3 se sembraron 8×10^6 linfocitos T primarios en una placa de 48 pocillos con 200 μ l de medio. La activación de los linfocitos T primarios se ejecutó usando Dynabeads™ Human T-Activator CD3/CD28 (11131D, Life Technologies) siguiendo el protocolo del proveedor de mezclar perlas y células 1:1. El polvo secado por pulverización se volvió a dispersar en agua exenta de nucleasas. Los controles consistentes en siGATA3 o siNC se prepararon con Tf-PEI o LF. Tras dos días de activación de los linfocitos T, las muestras se aplicaron a las células, alcanzando de este modo una concentración final de ARNip a 100 nM. Las células se incubaron durante 48 h y, tras retirar las Dynabeads, se lisaron con el minikit PureLink RNA siguiendo el protocolo del fabricante (12183025, Thermo Fisher Scientific). En resumen, las células se lavaron, se lisaron, y se aisló el ARN con una etapa adicional de digestión con desoxirribonucleasa. Después, se sintetizó ADNc usando el kit de síntesis de ADNc de alta capacidad (n.º 4368814, Applied Biosystems). Tras obtener el ADNc, la solución se diluyó 1:10 y se realizó una qRT-PCR con cebadores directos e inversos de GATA3 sintetizados a medida (Thermo Fisher) y cebadores de β -actina (Qiagen, Hilden, Alemania) para la normalización. Los umbrales de ciclo se adquirieron mediante ajuste automático dentro del *software* qPCRsoft (Analytik Jena AG, Jena, Alemania).

[0072] Ejemplos y realizaciones a base de suspensiones acuosas que comprenden nanopartículas lipídicas:

45 Preparación de nanopartículas lipídicas (NPL) de atrapamiento de ARNip:

[0073] Las formulaciones de NPL-ARNip tenían una composición lipídica basada en la formulación Onpattro [58, 59], clínicamente aprobada, y se prepararon como se ha descrito anteriormente [59, 60]. En resumen, se disolvieron componentes lipídicos (lípidio catiónico ionizable tipo MC3, lípido auxiliar, colesterol y PEG-DMG) en proporciones molares de 50:10:38,5:1,5 % molar en etanol hasta una concentración de lípido total de 10 mM. Se usaron diferentes lípidos ayudantes, es decir, 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfolina (DSPC), 1,2-dioleoil-3-trimetilamonio-propano (DOTAP) y 1,2-distearoil-sn-glicero-3-fosfo-(1'-rac-glicerol) (DSPG), para permitir la formación de sistemas de NPL-ARNip con potencial zeta casi neutro, positivo y negativo, respectivamente. El ARNip purificado (siGFP) se disolvió en tampón de acetato sódico a 25 mM pH 4 para conseguir un cociente de N/P de 3. Las dos soluciones se mezclaron a través de un mezclador en T a un caudal total de 20 ml/min, y una proporción de caudales de 3:1 v/v (fase acuosa:fase orgánica). La suspensión de NPL resultante se dializó posteriormente durante la noche en PBS pH 7,4, filtrada de forma estéril (0,2 μ m) y concentrada a ARNip a 0,5 mg/ml. Las eficiencias de encapsulación de siGFP en los sistemas NPL fueron superiores al 95 %, medidas mediante el ensayo Quant-iT Ribogreen (Life Technologies). Las soluciones madre de las formulaciones de NPL-ARNip se diluyeron hasta una concentración de 30 μ g de ARNip en 4500 μ l de un disolvente específico (agua altamente purificada (AAP)), lactosa, trehalosa o manitol, 5 p/p).

Secado por pulverización

[0074] Para la preparación de micropartículas se usó un equipo B-290 (Büchi Labortechnik, Essen, Alemania). Se usaron tubos Pumpsil de 1,6 mm \times 1,6 mm (Watson Marlow Tubing, Falmouth, Reino Unido) con una velocidad de bombeo de 1,4 ml/min. Se usó nitrógeno como gas de atomización, en donde el gas de secado era aire. Para evitar el

polvo y otras partículas suspendidas en el aire, tanto el suministro de nitrógeno como el de aire se filtraron a través de un poro de 0,22 µm. Para garantizar un calentamiento suficiente del suministro de aire y evitar el sobrecalentamiento de la bomba de vacío Büchi, se usó aire a presión. El aspirador se ajustó al 70 % y el vacío se ajustó a -40 mbar ajustando el nivel de aire presurizado. El caudal de aire se fijó en 40 mm, lo que corresponde a 473 NI/h. Para la recogida de partículas, se acopló un ciclón de alta eficiencia. Las NPL se prepararon en lactosa al 5 % p/v (Inhalac), trehalosa o manitol. Todas las formulaciones se prepararon en el mismo día para evitar diferencias interdiarias relacionadas con la temperatura y la humedad ambiente, por ejemplo. Para el análisis se produjeron tres lotes en tres días diferentes. Las temperaturas de entrada (T-En.) se variaron como se indica (T-En.= 60 °C, 80 °C, 100 °C o 120 °C) y, en consecuencia, dieron como resultado temperaturas de salida (T-Sal.) medidas más bajas (T-Sal.= 41 °C, 51 °C, 62 °C o 72 °C). Durante el proceso de secado por pulverización, se observaron cambios menores de la T-Sal. Por consiguiente, La T-Sal. se informó como la media con una desviación de $\pm 2,0$ °C.

Mediciones del promedio de Z y del PDI

15 **[0075]** Para los experimentos de redispersabilidad de las formulaciones secadas por pulverización, aproximadamente 3,5 mg de las formulaciones de matriz al 5 % se disolvieron en 70 µl de AAP. Todas las muestras se analizaron en cubetas desechables (Brand GmbH, Wertheim, Alemania) y se analizaron con el Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc., Malvern, Reino Unido). Por lo tanto, se ajustó el índice de refracción del agua, manitol, trehalosa o lactosa a 25 °C para las concentraciones indicadas, y la detección se realizó con un ángulo de retrodispersión de 173°. Para cada experimento, se realizaron mediciones por triplicado con 15 ejecuciones cada una y se promediaron posteriormente.

Contenido de agua residual

25 **[0076]** Para las micropartículas de lactosa, trehalosa y manitol, se pesaron aproximadamente 10 mg en un vial 2R, respectivamente. Se midieron tres lotes diferentes por triplicado, cada uno. Además, se preparó un patrón de agua al 1 % con aproximadamente 20 mg. Después del llenado, se aplicó un pequeño trozo de lana cerámica (Analytik Jena AG, Jena, Alemania) por encima para evitar la succión de partículas a través del valorador. Los viales se cerraron con un tapón de plástico. Los viales vacíos que actuaban como valores en blanco se trataron en consecuencia. Para las mediciones coulombimétricas se usó un Valorador Karl Fischer Aqua 40.00 con el *software* correspondiente de Analytik Jena AG (Jena, Alemania). Primero se calentó el horno a 100 °C y se limpió el sistema de humedad residual introduciendo un vial vacío cerrado y activando la bomba hasta alcanzar una deriva final inferior a 10,0 µg/min. Se usó la deriva especificada y las condiciones de tope se fijaron en un tiempo total de medición de 10 minutos o hasta que la deriva alcanzó $\leq 2,0$ µg/min de la deriva inicial. Se realizaron mediciones en blanco que se sustrajeron automáticamente del patrón y de las muestras. Las mediciones se consideraron correctas si la medición del patrón de agua al 1 % daba como resultado un valor entre 0,9 y 1,1 %.

Calorimetría diferencial de barrido

40 **[0077]** Para las mediciones calorimétricas se pesaron de 5 a 10 mg de muestra en una bandeja cóncava y se cerró. La referencia era una bandeja cóncava vacía y cerrada. La referencia y la muestra se introdujeron en el horno a un punto de ajuste de 25 °C y se cerró el horno. Las mediciones se realizaron con un DSC 214 Polyma (Erich NETZSCH GmbH & Co. Holding KG, Selb, Alemania) a partir de -10 °C con una rampa de 8° K/min hasta alcanzar una temperatura de 200 °C para las formulaciones de lactosa. Los datos se analizaron con el *software* Proteus Analysis.

Atenuación *in vitro*

50 **[0078]** Para el rendimiento de la atenuación *in vitro* se usó una línea de cáncer de pulmón no microcítico H1299 (ATCC CRL-5803) que expresaba de forma estable la proteína de fluorescencia verde mejorada (GFP). Las células se cultivaron en RPMI-1640 suplementado con FBS (10 %), P/S (1 %) y G418 (0,4 %) para la selección a 37 °C con CO₂ al 5 %. Las células se sembraron en placas de 24 pocillos con una densidad de 2×10^5 células por pocillo y un volumen total de 500 µl de medio. El día de la transfección, se sustituyó el medio por 400 µl de medio fresco y se aplicaron 100 µl de muestras para obtener una concentración final como se indica en las figuras (2 µg/ml equivale a una concentración de siGFP de 111 nM o ARNip de control desordenado). Después de 48 h, se desechó el medio, las células se lavaron con PBS, se tripsinizaron y se recogieron. Después de centrifugar a 400 rcf durante 5 minutos, el sobrenadante se desechó y el sedimento celular se resuspendió en PBS/EDTA a 2 mM. Las muestras se analizaron mediante citometría de flujo (citómetro de enfoque acústico Attune®, Life Technologies) y se midió la mediana de la intensidad de fluorescencia (MIF) usando una excitación de 488 nm y un conjunto de filtros de emisión de paso de banda de 530/30 nm (BL-1H). Las muestras se analizaron por triplicado para cada lote, con cada muestra separada por morfología basada en la dispersión hacia delante/hacia los lados para un conjunto de 10.000 células viables. Los triplicados de cada lote se resumieron generando el valor medio.

Estadística

65 **[0079]** Se comprobó si los datos experimentales presentaban diferencias significativas mediante el programa GraphPad Prism 5, usando mediciones repetidas ANOVA unidireccionales o bidireccionales, con la prueba *a posteriori*

de Bonferroni o Dunnetts con $p < 0,05$ considerada no significativa (ns), y $p > 0,05$, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

[0080] Las realizaciones ventajosas y las realizaciones comparativas se discuten a continuación con referencia a las figuras, que muestran:

- 5 Fig. 1A: cuantificación de siGFP tras el secado por pulverización de los poliplejos (N/P = 5) a varias T-En./T-Sal.;
- Fig. 1B: gel de agarosa de los poliplejos redispersados tras el secado por pulverización con la T-En. indicada. La siGFP se liberó de los poliplejos tras la incubación con heparina. Carril 1: patrón interno (Pi), Carril 2: polvo secado por pulverización a T-En. de 65 °C, Carril 3: polvo secado por pulverización a T-En. de 145 °C Carril 5: escalera de pares de bases de ADN de rango bajo;
- 10 Fig. 1C: cuantificación de siGFP tras el bombeo de poliplejos a través de tubos de silicio estándar y tubos Pumpsil. (n = 3);
- 15 Fig. 2: mediciones de DLS de poliplejos recién preparados (barras gris oscuro) y redispersados (barras gris claro). El PDI se indica con círculos rojos. (n = 3);
- Fig. 3: gel de agarosa de los poliplejos redispersados tras el secado por pulverización con manitol o trehalosa con la T-En. indicada. La siGFP se liberó de los poliplejos tras la incubación con heparina. M5/T5: formulación de manitol/trehalosa al 5 % m/v de siGFP-PPP; secada por pulverización. M10/T10: formulación de manitol/trehalosa al 10 % m/v de siGFP-PPP; secada por pulverización. L: escalera de pares de bases de rango ultrabajo;
- 20 Fig. 4: cuantificación de A) ARNip (siGFP) y B) polímero (PPP) tras el secado por pulverización a dos temperaturas diferentes con dos excipientes diferentes a dos concentraciones diferentes. (n = 4)
M5/T5: formulación de manitol/trehalosa al 5 % m/v de siGFP-PPP; secada por pulverización.
M10/T10: formulación de manitol/trehalosa al 10 % m/v de siGFP-PPP; secado por pulverización;
- 25 Fig. 5A: mediciones de DSC de formulaciones de trehalosa: 1.2) T5-120 °C, 2.2) T5-145 °C, 3.2) T10-120 °C, 4.2) T10-145 °C, 5.2) trehalosa deshidratada;
- Fig. 5B: mediciones de DSC de formulaciones de manitol: 1.2) manitol crist., 2.2) T5-120 °C, 3.2) T5-145 °C, 4.2) T10-120 °C, 5.2) T10-145 °C;
- 30 Fig. 6A: mediciones de XRPD de formulaciones de trehalosa secadas por pulverización a T-En./T-Sal. de 145 °C/79 °C;
- Fig. 6B: mediciones de XRPD de formulaciones de manitol secadas por pulverización a T-En./T-Sal. de 145 °C/79 °C;
- 35 Fig. 7: distribución granulométrica medida por SLS de M5-145 °C, M10-145 °C, T5-145 °C, T10-145 °C;
- Fig. 8A-D: imágenes de SEM de A) T5-145 °C B) T10-145 °C C) M5-145 °C D) M10-145 °C. Las flechas blancas marcan los puentes de agua entre partículas individuales de trehalosa;
- 40 Fig. 9: atenuación *in vitro* de GFP dentro de una línea celular H1299 que expresa de forma estable eGFP. Dentro de cada grupo, las muestras contienen la misma cantidad de excipiente que la indicada en la leyenda. LF: lipofectamina, PPP: copolímero de bloques de PEG-PCL-PEI, siNC: ARNip de control negativo, siGFP: secuencia de ARNip contra eGFP, SP: poliplejos secados por pulverización consistentes en PPP y siGFP al 5 % (p/v) de contenido sólido total a T-En. de 145 °C;
- 50 Fig. 10: atenuación *ex vivo* de GATA3 dentro de linfocitos T CD4+ primarios; LF: lipofectamina, Tf-PEI: PEI conjugado con transferrina, siNC: ARNip de control negativo, siGATA: secuencia de ARNip contra GATA3, M5-145 °C/T5-145 °C: poliplejos secados por pulverización de Tf-PEI y siGATA a T-En. de 145 °C con manitol al 5 % o trehalosa al 5 %;
- 55 Fig. 11: secado por pulverización de nanopartículas consistentes en siGFP y PEG-PCL-PEI (PPP) en solución de trehalosa al 5 % (A) y el posterior proceso de secado de las micropartículas nanoincorporadas (NIM) a la misma temperatura durante 5 minutos (B). Los parámetros de secado por pulverización se fijaron en 145 °C para la temperatura de entrada (T-En.), un rendimiento del aspirador del 70 % y un flujo de aire de 40 mm (473 Nl/h). El flujo de la bomba se ajustó a 1,4 ml/min y se detuvo para el secado posterior;
- 60 Fig. 12: pérdida de siGFP y PPP tras el secado posterior de nanopartículas secadas por pulverización en solución de trehalosa al 5 %. El tiempo de secado posterior fue de cinco minutos. La pérdida de siGFP se detectó mediante el ensayo HepSYBR y la pérdida de PPP mediante el ensayo TNBS. Las funciones de datos
- 65

indican la media \pm DE. (n = 4),

- 5 Fig. 13: humedad residual de nanopartículas secadas por pulverización antes y después del secado posterior. Caracterización de Karl-Fischer de nanopartículas de siGFP-PPP secadas por pulverización en trehalosa al 5 % antes y después del secado posterior (n = 4). ANOVA unidireccional, prueba *a posteriori* de Tukey, **P <0,05,
- 10 Fig. 14: mediciones de DLS de NPL recién preparadas (barras marrón oscuro) y redispersadas (barras marrón claro). El PDI se indica con cuadrados negros. (n = 3) Se redispersaron formulaciones de NPL con carga neutra (neutr), positiva (+) o negativa (-) tras el secado por pulverización a 80 °C o 100 °C,
- Fig. 15: mediciones DSC de formulaciones de lactosa: 1.3) L5 100 °C, 2.3) L5 NPL- 80 °C, 5.3) L5 NPL- 100 °C, 6.3) L5 NPL+ 80 °C, 7.3) L5 NPL+ 100 °C, 8.3) L5 n NPL 80 °C, 9.3) L5 n NPL 100 °C,
- 15 Fig. 16: mediciones de DSC de formulaciones de manitol: 1.3) M5 NPL-100 °C, 2.3) M5 NPL+ 100 °C 3.3) M5 n NPL 100 °C 4.3) M5 100 °C,
- Fig. 17: atenuación *in vitro* de GFP dentro de una línea celular H1299 que expresa de forma estable eGFP. Dentro de cada grupo, las sLNP contienen ARNcd: ARNip de control negativo (desordenado) o siGFP: secuencia de ARNip contra eGFP. La formulación 1 (NPL neutra) es una NPL neutra que contiene la formulación Onpattro™. La formulación 2 (NPL negativa) es una NPL negativa que contiene DSPG, y la formulación 3 (NPL positiva) es una NPL positiva que contiene DOTAP,
- 20 Fig. 18: atenuación *in vitro* de GFP dentro de una línea celular H1299 que expresa de forma estable eGFP. Las células se trataron solo con lactosa al 5 % o con NPL redispersadas secadas por pulverización a la temperatura indicada y añadidas a las células a la concentración indicada en la formulación (NPL neutras (n), positivas (+) o negativas (-)) indicada,
- 25 Fig. 19: atenuación *in vitro* de GFP dentro de una línea celular H1299 que expresa de forma estable eGFP. Las células se trataron solo con manitol al 5 % o con NPL redispersadas secadas por pulverización a la temperatura indicada y añadidas a las células a la concentración indicada en la formulación (NPL neutras (n), positivas (+) o negativas (-)) indicada.
- 30

35 **[0081]** Ejemplos y realizaciones a base de suspensiones acuosas que comprenden poliplejos:

Evaluación e integridad del calor

40 **[0082]** El secado por pulverización es una técnica muy conocida para preparar micropartículas. Sin embargo, el calor es un parámetro crucial que podría tener un efecto tremendo sobre el ARNip. Por consiguiente, se secaron por pulverización los poliplejos en presencia de trehalosa (10 % m/V) a varias temperaturas de entrada (T-En.), lo que dio como resultado las temperaturas (T-Sal.) respectivas en las proximidades de la abertura de salida. La Figura 1 muestra tres ejemplos inventivos con una T-Sal. inferior a 90 °C y un ejemplo comparativo con una T-Sal. de 100 °C. Como se muestra en la Figura 1, el aumento de T-En. hasta 170° y la respectiva T-Sal. de 89 °C no tuvieron ningún efecto significativo sobre la cantidad de siGFP. A T-En./T-Sal. de 200 °C/100 °C, se detectó un aumento significativo de la pérdida de siGFP.

45

50 **[0083]** Como el ARNip no marcado se funde a unos 90 °C y pasa de la forma bicatenaria a la monocatenaria, se descubrió, de acuerdo con la invención, que la formación de poliplejos y su incorporación a las matrices de los excipientes no protegía ni estabilizaba térmica o químicamente el ARNip de forma significativa, haciéndolo menos sensible al calor y permitiendo temperaturas de secado por pulverización más elevadas, especialmente T-Sal., en comparación con el ARNip no marcado respectivo. Por tanto, es un logro importante de la invención que el éxito del secado por pulverización con pérdidas minimizadas de ARNip intacto incluya evitar calentar la formulación de ARNip a una temperatura superior a la temperatura de fusión del ARNip no marcado durante largos períodos de tiempo.

55 **[0084]** La temperatura del producto alcanzada durante el proceso de secado por pulverización se determina como la T-Sal. [29] Por consiguiente, la temperatura que afecta al producto es igual a T-Sal. y, por lo tanto, crucial para la estabilidad y la integridad. Para T-En. a 200 °C y posterior T-Sal. a 100 °C, parece haberse producido la fusión del ARNip y, en consecuencia, una mayor susceptibilidad a la degradación. [22, 30] Estas altas temperaturas también pueden provocar la disociación de los poliplejos y la liberación del ARNip de los poliplejos. Por lo tanto, la protección del ARNip contra el calor y las fuerzas de cizallamiento podría verse impedida, lo que podría explicar la mayor pérdida a temperaturas tan elevadas. Sin embargo, la pérdida de ARNip es restringida, ya que el tiempo de exposición de los poliplejos a estas temperaturas es extremadamente bajo. Además, se observó una gran variación en la recuperación del ARNip, reflejada en una desviación estándar comparativamente grande, para condiciones de pulverización a T-En./T-Sal. de 170 °C/89 °C. En este caso, T-Sal. con una pequeña desviación (89° \pm 1,5 °C) justo alcanzó la temperatura de fusión del ARNip. De nuevo, esto podría inducir la fusión en algunos casos, conduciendo a mayores pérdidas de ARNip. Por lo tanto, la temperatura que puede usarse para la preparación de ARNip a través de secado

60

65

por pulverización con una pérdida mínima ventajosa de ARNip en este caso se determina a T-En. de 145 °C y una T-Sal. posterior de 79 °C. Además, parece posible que el secado por pulverización también pueda realizarse con éxito sin pérdidas elevadas a una T-En. aún mayor si el equipo se configura y el método se lleva a cabo de forma que la T-Sal. se mantenga por debajo de 90 °C. Esto podría conseguirse, por ejemplo, aumentando la velocidad de alimentación o de aspiración al mismo tiempo que se aumenta la T-En. [29]

[0085] Como la cuantificación del ARNip descrita en el presente documento se basa en la intercalación de un colorante fluorescente que no refleja la integridad del ácido nucleico, este último debe confirmarse por separado. Esto se consiguió a través del ensayo de retardo de gel con muestras obtenidas a la T-En. más baja y a la T-En. más alta aceptable (145 °C). La Figura 1B confirma la longitud del dúplex de aproximadamente 25 pb para el patrón interno así como para las muestras secadas por pulverización obtenidas con ambos parámetros de proceso. Por consiguiente, se mantuvo la integridad del ARNip en el material recuperado incluso a T-Sal. de 79 °C.

[0086] Aunque se redujeron las T-En./T-Sal. para minimizar las pérdidas de ARNip y se confirmó la integridad del dúplex, las pérdidas de ácido nucleico seguían siendo bastante elevadas, con aproximadamente un 40 %. Para dilucidar aún más las razones de estas pérdidas, se investigó el efecto del bombeo de suspensiones de poliplejos desde el contenedor de muestras al secador por pulverización. Para probar este efecto, se bombeó una suspensión de poliplejo a través del tubo de silicio conectado al secador por pulverización y se recogió después. Curiosamente, la cuantificación de siGFP tras el bombeo con tubos de silicio de calidad regular, que se usó en los experimentos mencionados anteriormente, reveló pérdidas de alrededor del 40 % (Figura 1C).

[0087] Estas pérdidas corresponden a las pérdidas detectadas de los poliplejos redispersados tras el secado por pulverización. Por lo tanto, se dedujo que las pérdidas medidas durante el secado por pulverización (Figura 1A) no están solemnemente vinculadas al proceso de secado por pulverización en sí, sino que también dependen de la etapa de bombeo y del material de entubación usado.

[0088] Se cree que el origen de la adsorción de siGFP se debe a interacciones hidrofóbicas que antes solo se investigaban para el ADN. [15] Además, se probó si un tubo de silicio de alta calidad reduciría la adsorción de ARNip. Y en efecto, las pérdidas de siGFP se redujeron al 0 % cuando se usaron tubos Pumpsil (Figura 1C). Una explicación del diferente comportamiento de adsorción de los poliplejos de ARNip en los tubos de silicio de alta calidad frente a los de calidad normal podría ser la abrasión que se produce en estos últimos y que da lugar a cavidades. Estos cambios superficiales conducen a un aumento y regeneración de la superficie y, en consecuencia, a un aumento de las posibles interacciones entre la siGFP y el material de entubación. Por lo tanto, los tubos de baja abrasión, tales como el Pumpsil, parecen ventajosos para el procesamiento de los poliplejos. Sin embargo, aún no se entiende totalmente el mecanismo detallado de adsorción.

Características de las nanopartículas

[0089] Además del calor, el secado por pulverización ejerce fuerzas de cizallamiento sobre las nanopartículas y podría desensamblar los poliplejos. Por consiguiente, se realizaron mediciones de DLS antes y después del secado por pulverización para visualizar cualquier posible efecto. Por lo tanto, las micropartículas se disolvieron en AAP para la redispersión de las nanopartículas para imitar la impactación y la disolución en el pulmón. Como se demostró en la Figura 2, los valores medios Z de los poliplejos recién preparados y redispersados no difieren entre sí desde el punto de vista estadístico. Además, no se observaron diferencias en el PDI. Sin embargo, se reconocieron altos valores de PDI que podrían explicarse en cierta medida por los monómeros de azúcar/alditol. Weinbuch *et al.* demostró que los monómeros de azúcar y alditol son visibles en soluciones muy concentradas. [31] Y en efecto, detectamos en consecuencia monómeros en torno a 1 nm que no son visibles si los poliplejos se preparan solemnemente en AAP (SI-Figura 1). Esta hipótesis se ve corroborada por el hecho de que, al aumentar la cantidad de excipiente, aumenta el pico a 1 nm (SI-Figura 1). Este fenómeno explica también la tendencia a valores de PDI más elevados en soluciones de excipientes más concentradas. No obstante, Los promedios de Z y el PDI no difirieron significativamente dentro de un mismo grupo de excipientes. Sin embargo, los poliplejos formulados con trehalosa mostraron valores de PDI más elevados que los formulados con manitol, lo que podría atribuirse de nuevo a un mayor contenido de monómeros. Resumiendo, el tamaño y la distribución de los poliplejos no se vieron afectados por el secado por pulverización dentro de cada formulación. Adicionalmente, para confirmar la integridad y, en consecuencia, la longitud de pares de bases del ARNip en todas las formulaciones, se realizó un ensayo en gel. La Figura 3 muestra que, independientemente de la formulación elegida y de la T-En. y T-Sal. respectivamente, el ARNip estaba intacto en todos los casos, lo que se refleja en que todas las bandas se detectaron con la misma longitud de pares de bases. No se detectaron bandas de menor peso molecular, que indicarían la degradación del ARNip. Los frotis que acompañan a todas las muestras secadas por pulverización se atribuyen a la heparina, como demuestran los efectos similares en la muestra que contiene ARNip libre mezclado con heparina, pero no en la muestra que contiene ARNip libre sin heparina. Por consiguiente, se declara que la longitud de pares de bases del ARNip no se vio influida por el secado por pulverización.

[0090] Sin embargo, el promedio de Z, el PDI y la longitud de pares de bases se consideran enfoques cualitativos para determinar el éxito del secado por pulverización, mientras que la determinación del ARNip y del contenido de polímero son cuantitativos y, en consecuencia, extremadamente relevantes para la dosificación correcta.

[0091] Por lo tanto, se analizó el contenido de ARNip en las partículas redispersadas y se observaron pérdidas considerables cuando los poliplejos se secaron por pulverización en presencia de manitol (Figura 4A). Aunque no significativo, pero digno de mención, es el hecho de que las pérdidas aumentaron aproximadamente del 17 % al 21 % al aumentar la temperatura. Esto es razonable, ya que una mayor temperatura del producto podría provocar mayores pérdidas, como se ha explicado anteriormente. Estos resultados también están en línea con una publicación de Wu et al. donde se secó por pulverización ARNip no marcado en presencia de manitol a T-Sal. entre 60 y 125 °C. [22] Sin embargo, cuando los poliplejos se secaron por pulverización con trehalosa no se detectó ningún cambio significativo en comparación con la cantidad aplicada de ARNip. Por consiguiente, se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la recuperación de ARNip tras el secado por pulverización entre las dos formulaciones de matriz diferentes a ambas temperaturas de secado por pulverización. Como analizado mediante ANOVA bidireccional, la elección del excipiente se identificó como la fuente de variación que representaba el 58,6 % de la variación total y un valor de *p* de 0,0013 que indicaba un efecto altamente significativo. De forma similar, la cuantificación de polímeros no dio lugar a diferencias en la recuperación tras el secado por pulverización cuando los poliplejos se formularon con trehalosa, pero mostró pérdidas de aproximadamente el 53 % y el 65 % cuando se formularon con manitol al 5 % o manitol al 10 %, respectivamente. En este caso, no pudieron detectarse diferencias estadísticas entre ambas temperaturas y concentraciones dentro de cada grupo de excipientes. Sin embargo, todas las formulaciones con manitol mostraron pérdidas de polímero significativamente mayores que sus homólogas formuladas con trehalosa. Por consiguiente, las formulaciones con manitol fueron superadas por sus homólogas formuladas con trehalosa en cuanto a la recuperación de ARNip y polímeros.

[0092] Esta observación podría explicarse por el hecho de que las formulaciones de trehalosa tienden a formar partículas amorfas, mientras que el manitol tiende a cristalizar tras el secado por pulverización. Otras publicaciones han demostrado que las estructuras amorfas pueden estabilizar las macromoléculas biológicas durante el secado. [32-35] Aunque este efecto no se había demostrado antes en la bibliografía sobre los poliplejos, no es sorprendente que la trehalosa también estabilice los poliplejos. Una explicación de este fenómeno es la teoría de la sustitución del agua. [36] Durante la desecación, la trehalosa estabiliza la estructura de las moléculas atrapadas formando puentes de hidrógeno y manteniendo la estructura tridimensional. Además, el mayor contenido de humedad residual de las formulaciones de trehalosa podría sumarse a este hecho permitiendo una mayor estabilización al formar puentes de hidrógeno adicionales y actuar como plastificante. En cambio, se demostró que el manitol cristalino estabiliza de forma ineficaz los biofármacos y podría no proteger la formulación de una disociación de las cadenas inducida por el estrés de secado o de la degradación potencial del ARNip bicatenario. [37] La disociación del ARNip bicatenario debido a las temperaturas cercanas al punto de fusión podría haber conducido a una menor detección del ARNip con la cuantificación por fluorescencia basada en la intercalación, como se describe en el capítulo 2.12, que no detecta el ARN corto monocatenario. Este mecanismo propuesto se ve reforzado por el hecho de que no pudo detectarse la detección de cepas más pequeñas de ácido nucleico bicatenario, que se encontraría si se hubieran producido roturas de la cadena doble (Figura 3).

Características de las micropartículas

[0093] El suministro pulmonar a través de formulación de polvo seco requiere una humedad residual baja para evitar procesos de agregación. Aunque ya se ha considerado anteriormente que la humedad residual puede actuar como plastificante estabilizando los poliplejos durante el proceso de secado por pulverización, no obstante, podría provocar la agregación de micropartículas y ser una fuente de inestabilidad microbiológica y de contaminación de la ribonucleasa. Por lo tanto, el contenido de agua de todas las formulaciones se midió mediante titulación de Karl Fischer. Como se refleja en la Tabla 1, las formulaciones con trehalosa presentaban entre un 4,6 y un 3,8 %, mientras que las formulaciones con manitol presentaban entre un 0,4 y un 0,2 % de humedad residual. Estos resultados eran de esperar y están en línea con los de la bibliografía. [38-40]

[0094] La trehalosa suele solidificarse tras el secado por pulverización en un estado amorfo que se confirmó a través de DSC (Figura 5). Además de la naturaleza higroscópica de la trehalosa, la razón de la formación de estructuras amorfas es la rápida etapa de secado, que no proporciona tiempo suficiente para que las moléculas de trehalosa se dispongan dentro de una estructura ordenada con la posterior nucleación y crecimiento de cristales. [41] Todas las formulaciones de trehalosa mostraron transiciones vítreas a temperaturas entre 38° y 53 °C correspondientes a su contenido de humedad residual (Tabla 1).

	Humedad residual (%)
T5-120 °C	4,53 ± 0,20
T5-145 °C	3,85 ± 0,05

T10-120 °C	4,61 ± 0,17
T10-145 °C	3,82 ± 0,04
M5-120 °C	0,40 ± 0,03
M5-145 °C	0,27 ± 0,04
M10-120 °C	0,26 ± 0,02
M10-145 °C	0,19 ± 0,03

Tabla 1

[0095] Esta temperatura (T_g) es importante para predecir la estabilidad durante el almacenamiento, ya que las formas sólidas amorfas son termodinámicamente inestables y tienden a cristalizar si se almacenan cerca o por encima de la T_g . [42] Como se ha discutido anteriormente en relación con la recuperación del ARNip tras el secado por pulverización, el estado amorfo de la formulación es favorable para la conservación de los poliplejos. Por consiguiente, para conservar estos productos a temperatura ambiente o en el frigorífico durante más tiempo, son necesarios valores de T_g elevados. Sin embargo, esto está estrechamente relacionado con el contenido de agua: cuanto mayor sea la humedad residual, menor será la T_g . [43] También, con un menor contenido de humedad residual es menos probable que se produzcan procesos de degradación. [43] Por lo tanto, es de gran interés disminuir aún más la cantidad de humedad residual en las formulaciones de trehalosa para evitar los procesos de nucleación y degradación a lo largo del tiempo y para mantener el estado amorfo de la formulación. Aunque aún no se ha investigado el impacto del almacenamiento sobre la calidad (tamaño, PDI) y la cantidad de los poliplejos, estos aspectos se están investigando actualmente en un esquema mayor de optimización de la formulación y de los parámetros del proceso. Para confirmar el estado amorfo de la trehalosa, las formulaciones se analizaron también mediante XRPD y se detectaron los típicos halos amorfos (Figura 6A). Por otro lado, las formulaciones de manitol secadas por pulverización presentaron el mismo perfil de temperatura que la sustancia cristalina de partida, con un pico de fusión a 170 °C como investigado mediante DSC (Figura 5B). Este hallazgo indica una forma cristalina de manitol. Para diferenciar claramente entre los polimorfos del manitol que podrían aparecer, se realizó XRPD en formulaciones preparadas a T-En. de 145 °C. Para ambas formulaciones de manitol ensayadas, se detectaron picos a 14,6° y 16,8° 2-theta, ambos vinculados a la forma β del manitol (Figura 6B). [41, 44] No se detectaron picos específicos para las formas α o δ , lo que indica que, tras el secado por pulverización, el manitol β es el polimorfo predominante. Aunque el tiempo de secado de las formulaciones secadas por pulverización es muy corto y podría haber dado como resultado un estado amorfo como el obtenido con la trehalosa, el manitol es menos higroscópico y menos soluble. Estas características conducen a que las soluciones de manitol se sequen más rápidamente y cristalicen durante el secado por pulverización. El contenido de humedad residual fue menor en las formulaciones preparadas a temperaturas más altas y no se encontraron diferencias significativas en las características de las nanopartículas entre las formulaciones preparadas a las dos temperaturas diferentes, todos los experimentos siguientes se realizaron con formulaciones producidas a una T-En. de 145 °C.

[0096] Para obtener una primera comprensión de las características del tamaño de las micropartículas, se realizó dispersión de luz estática en éter dietílico, en el que ni el manitol ni la trehalosa son solubles. Como se visualiza en la Figura 7, las formulaciones difieren entre sí dependiendo de la naturaleza del excipiente del que están hechas: ambas formulaciones de manitol muestran valores significativamente inferiores en los percentiles 10, 50 y 90 en comparación con las formulaciones de trehalosa (datos no mostrados). Las formulaciones de manitol presentaron medianas de los tamaños geométricos de alrededor de 7 y 8 μm para las formulaciones al 5 y al 10 %, respectivamente, mientras que las formulaciones con trehalosa mostraron tamaños de alrededor de 24 μm (Tabla 2).

	Mediana del diámetro geométrico	MMAD (μm)	DEG (μm)	FPF (%)	DPF (μg)
T5-145°	24,13 ± 1,47	4,65 ± 0,14	1,88 ± 0,07	14,0 ± 2,4	0,15 ± 0,09
T10-145°	24,02 ± 1,85	5,19 ± 0,47	1,95 ± 0,04	18,3 ± 5,0	0,11 ± 0,03
M5-145°	6,77 ± 0,35	4,77 ± 0,15	1,94 ± 0,03	32,3 ± 5,3	0,54 ± 0,05
M10-145°	8,02 ± 1,11	5,50 ± 0,29	1,97 ± 0,06	22,5 ± 2,4	0,21 ± 0,07

Tabla 2

[0097] Esto puede explicarse por el hecho de que las partículas amorfas de trehalosa con mayor humedad residual muestran una tendencia a la fusión de partículas a través de puentes de agua. [45] Por consiguiente, aunque de hecho se produjeron partículas con diámetros similares a los de las formulaciones de manitol, como se ha confirmado mediante SEM (Figura 8), estas partículas se agregan y pueden formar partículas secundarias mayores. Esta agregación puede apreciarse en las micrografías SEM (Figura 8). Mientras que los registros de partículas de manitol

confirman los hallazgos de las mediciones de SLS, las partículas de trehalosa presentan diámetros mucho más pequeños. Adicionalmente, pueden observarse puentes de agua, como indican las flechas blancas. De nuevo, la reducción del contenido en agua de las micropartículas de trehalosa podría reducir considerablemente este efecto. En cuanto a la superficie de las partículas, en general, las formulaciones de manitol presentaban una estructura redondeada muy suave. Las partículas de trehalosa también mostraban superficies agradablemente lisas cuando se formulaban al 10 %, mientras que las formulaciones al 5 % indicaban una superficie algo rugosa.

[0098] Para el suministro pulmonar, los tamaños aerodinámicos entre 1 y 5 μm son cruciales para el éxito del suministro, como se ha discutido anteriormente. Aunque las medianas de los tamaños geométricos eran superiores a 5 μm , el diámetro aerodinámico también depende de la densidad de las partículas y de la porosidad, por lo que podría ser menor que el diámetro geométrico. [46] De hecho, las mediciones del ARNip impactado en el NGI revelaron valores de MMAD cercanos o inferiores a 5 μm para las formulaciones de trehalosa y manitol, lo que indica un suministro pulmonar satisfactorio. Además, el cálculo de la DEG indica una distribución de partículas que puede considerarse para la aplicación pulmonar. La FPF se considera como el porcentaje de fármaco que se suministró en partículas inferiores a 5 μm en comparación con el fármaco total impactado en todos los estadios del NGI. Cuanto mayor sea la FPF, mayor será la cantidad de fármaco que podrá suministrarse en el lugar de acción. En consecuencia, las fracciones de partículas finas con aproximadamente un 27 % para ambas formulaciones de trehalosa y aproximadamente un 37 % para ambas formulaciones de manitol, respectivamente, se consideran muy buenas. Mientras que solo pequeñas cantidades de partículas recogidas en el NGI eran inferiores a 5 μm y potencialmente podían alcanzar bronquiolos y alvéolos, el asma es una enfermedad bronquial, y la deposición en las vías respiratorias mayores puede lograrse también con partículas de más de 5 μm . Sin embargo, para optimizar la dosis depositada y disminuir los posibles efectos secundarios, la disminución de la MMAD sería favorable. En comparación con la FPF, la DPF se considera como la dosis de fármaco en μg que se suministró realmente en partículas con menos de 5 μm . Por lo tanto, no se trata de una proporción, sino de una dosis exacta que podría aplicarse. En este caso, la DPF difirió entre las formulaciones de manitol y trehalosa: mientras que las formulaciones de manitol podrían liberar potencialmente más de 0,5 μg , las formulaciones de trehalosa descritas anteriormente solo podrían liberar actualmente menos de 0,2 μg de ARNip. Aunque la FPF en los poliplejos formulados con trehalosa fue mucho menor, este hallazgo no puede explicar por sí solo la discrepancia en la DPF. Para explicar este fenómeno, hay que tener en cuenta que, para los cálculos del FPF, solo se considera la cantidad depositada de fármacos en el interior del NGI. No se consideran las deposiciones en el preseparator, puerto de inducción o incluso en el propio dispositivo Handihaler. Y en efecto, se encontró una gran cantidad de polvo en las paredes interiores del estante de cápsulas del dispositivo de aplicación que, lamentablemente, no se pudo cuantificar. Este hallazgo solo se observó para la trehalosa y no para las formulaciones de manitol. La explicación más razonable de esta observación podría ser la estructura amorfa del polvo y la mayor humedad residual de las formulaciones con trehalosa. Tras la liberación del polvo desde la cápsula a través del vacío y las fuerzas centrífugas así generadas, las partículas se ven obligadas a abandonar el Handihaler siguiendo la corriente de aire. Las partículas más pequeñas y, en consecuencia, más ligeras, pueden seguir directamente la corriente de aire, mientras que una gran parte de las partículas que puedan estar agregadas seguirán la corriente de aire solo después de impactar y rebotar en la pared interior del bastidor de la cápsula, de este modo, posiblemente desagregándose. Sin embargo, debido al alto contenido de agua residual y a la posterior plasticidad de las partículas de trehalosa, una gran cantidad de polvo podría adherirse a la pared quedando dentro de dispositivo. Esto explica por qué se calcularon valores adecuados para MMAD y DEG y FPF de -27 % basados en la cantidad de fármaco depositado en el interior del NGI desde las formulaciones de trehalosa. Por otra parte, no se detectaron polvos de manitol en el bastidor de la cápsula y, en consecuencia, se indica que se introduzcan con éxito en el NGI sin más pérdidas.

[0099] Desde la evaluación global de las propiedades de las micropartículas, concluimos, por lo tanto, que las estructuras cristalinas superan a las sustancias amorfas en todas las propiedades analizadas, aunque el estado amorfo pareciera favorable en lo que respecta a la estabilidad de los poliplejos.

50 Rendimiento *in vitro*

[0100] Para el suministro de ARNip es fundamental mantener la bioactividad de la molécula. Por consiguiente, se reconstituyó el polvo secado por pulverización y se transfectaron células H1299 que expresan proteína de fluorescencia verde mejorada con los poliplejos redispersados. La lipofectamina (LF) es un agente transfectante estándar *in vitro* y se usa como control positivo. [47] Se usa para mostrar el máximo efecto posible de los ácidos nucleicos, es decir, en el presente documento, la regulación por disminución del ARNm por el ARNip y la posterior expresión de la proteína (GFP). En todos los casos el ARNip fue activo, ya que la expresión de GFP disminuyó significativamente (Figura 9). Curiosamente, los complejos lipofectamina-siGFP usados en la formulación *in vitro* estándar con glucosa al 5 % mostraron la mayor reducción observada en los cinco grupos, que es >95 % en reducción relativa (en comparación con LF-siNC que contiene una secuencia de ARNip de control negativo). La lipofectamina formulada con trehalosa o manitol con la concentración respectiva de excipiente, aunque tuvo éxito en la regulación por disminución, solo mostró una reducción relativa entre el 70 y el 80 %. Un posible mecanismo de esta discrepancia podría explicarse por el hecho de que la transfección es un proceso que consume energía y, por lo tanto, son favorables los factores que proporcionan energía a las células, tales como la glucosa. [48] Por lo tanto, intercambiar la glucosa por trehalosa o manitol podría disminuir este efecto positivo y las células podrían captar las partículas de forma menos eficaz que en el grupo de referencia de glucosa. No está claro si este efecto o la viscosidad de las

soluciones matriciales usadas en el presente documento son la causa de la disminución de la transfección, por lo que forma parte de futuras investigaciones.

[0101] En estudios anteriores, los poliplejos hechos de PPP y ARNip ya mostraron eficiencias de atenuación del 50 % *in vitro* [49] e incluso >70 % *in vivo* donde la lipofectamina no es estable y es demasiado tóxica. [9] Por consiguiente, es de gran importancia conservar la capacidad y la eficacia de transfección durante el secado por pulverización para los experimentos *in vitro* y los estudios de seguimiento *in vivo*. Como se demostró en la Figura 9, los poliplejos formados por siGFP y PPP obtuvieron mejores resultados que sus formulaciones de control negativo (PPP-siNC). De forma importante, todos los poliplejos secados por pulverización (SP) funcionaron tan bien como sus homólogos recién preparados. Este efecto es independiente de la naturaleza del excipiente y de su concentración (marcada en gris).

[0102] Tras confirmar la bioactividad, estos conocimientos se transfirieron a un modelo clínicamente más relevante en el que se intentó regular por disminución la proteína 3 de unión a GATA (GATA3) en los linfocitos T CD4+. En asma grave no controlada, las células Th2 desempeñan un papel crucial en la activación de los efectos secundarios que orquestan la manifestación completa del asma, causada por una expresión regulada por aumento de GATA3. [50] La regulación por disminución de tales proteínas sobreexpresadas podría conducir a un perfeccionamiento significativo y, por tanto, a un beneficio en la terapia y en la frecuencia de administración, como se ha demostrado para otras terapias basadas en ARNip. [51] Por lo tanto, el sistema de suministro que este grupo ha optimizado para la transfección de ARNip en linfocitos T, en concreto PEI acoplado a transferrina (Tf-PEI), [52] se secó por pulverización junto con dos secuencias de ARNip dirigidas a GATA3. La cantidad de siGATA se cuantificó como se describe anteriormente para garantizar la cantidad para la transfección. Después de dos días de incubación, se analizó la cantidad de ARNm de GATA3 y se normalizó con respecto a β -actina. Como se esperaba, La lipofectamina no mostró diferencias significativas entre el ARNip de control negativo y el siGATA (Figura 10). Sin embargo, los poliplejos recién preparados que consisten en Tf-PEI y siGATA mediaron una reducción significativa de la expresión de GATA3, y la mayoría de todos los poliplejos de Tf-PEI y siGATA que se secaron por pulverización con manitol al 5 % (M5-145°) mostraron efectos idénticos. De forma importante, la eficacia de silenciamiento génico de M5-145° no difirió significativamente de la de los poliplejos recién preparados que contenían siGATA, lo que confirma la conservación de la bioactividad y la eficacia de la transfección. Sin embargo, los poliplejos que se secaron por pulverización con trehalosa al 5 % no mostraron transfección alguna. Esto es sorprendente, ya que se esperaba que las sustancias amorfas como la trehalosa estabilizaran la transferrina, una proteína de 79 kDa, en mayor medida que el manitol cristalino, especialmente porque se sabe que este último excipiente induce la agregación de proteínas en el secado por pulverización. [53] Sin embargo, en este caso, las formulaciones de manitol estabilizaron la transferrina igual de bien y permitieron una transfección exitosa. Una razón plausible para la falta de silenciamiento génico de la formulación con trehalosa podrían ser los problemas de redispersión en los volúmenes más bien pequeños usados para la transfección, teniendo en cuenta su tendencia a la agregación que se muestra en la Figura 8. La estabilización exitosa de la transferrina en las formulaciones de manitol podría lograrse potencialmente mediante la PEI en los poliplejos. La PEI participa en la formación de poliplejos, pero también podría interactuar dentro de la transferrina directamente. Y en efecto, como se demostró, la PEI es capaz de reticular físicamente una proteína y aumentar su estabilidad durante las tensiones inducidas por los cambios de pH y la agitación. [54] Esto podría explicar el mantenimiento de la estabilidad y la conformación de la Tf que permite el reconocimiento de los receptores de Tf de los linfocitos T con los poliplejos decorados con Tf. Otras investigaciones se centrarán en la formación de agregados de proteínas, la estructura secundaria y la cinética de unión de la Tf cuando se seca por pulverización sola, en mezcla con PEI y como conjugado Tf-PEI en manitol o trehalosa para una mejor comprensión de los procesos subyacentes a estos hallazgos.

Etapa adicional de secado por pulverización

[0103] Para una ejecución de secado por pulverización, se diluye una cantidad total de 30,00 μ g de siGFP con una solución de trehalosa al 5 % en agua exenta de ribonucleasa hasta un volumen total de 250 μ l. Los poliplejos se preparan con un cociente de N/P de 10. Por lo tanto, se diluye también la cantidad necesaria de PPP [1] con una solución de trehalosa al 5 % en agua exenta de ribonucleasa hasta un volumen de 250 μ l. La solución de PPP se añade a la solución de siGFP y se pipetea enérgicamente arriba y abajo. Se incuba durante 20 minutos para la formación de poliplejos. Posteriormente, se añaden 4500 μ l de solución de trehalosa al 5 % a la suspensión de poliplejos. Se gira el tubo con cuidado para mezclar. Al mismo tiempo, el secador de pulverización está encendido; los parámetros se ajustan a una temperatura de entrada de 145 °C, aspirador al 70 %, un caudal de aire de 40 mm (473 NI/h) y refrigeración por agua de la boquilla. El agua exenta de ribonucleasa se seca por pulverización a 1,2 - 1,4 ml/min. Si se alcanza una temperatura de entrada constante de 145 °C, se inicia el proceso de secado por pulverización con la dispersión de poliplejo-trehalosa. Al final del proceso, el tubo de muestra se sustituye por agua exenta de ribonucleasa que se seca por pulverización durante otros 2 minutos. En lo sucesivo en el presente documento, la bomba se detiene. El proceso de secado por pulverización finaliza y se inicia posteriormente la etapa de secado por pulverización de las micropartículas nanoincorporadas. Se fija un temporizador de cinco minutos y se mantienen constantes todos los demás parámetros. Por lo tanto, el secado posterior tiene lugar a 145 °C de temperatura de entrada, como se indica en la Figura 11. Finalmente, se detiene el proceso de secado por pulverización y se recoge el polvo secado por pulverización.

[0104] Después del proceso de secado, se recoge todo el polvo, se pesa y se usan alícuotas para análisis

posteriores. Para cuantificar el contenido de PPP y siGFP dentro del polvo de micropartículas tras el secado por pulverización, se disolvió una alícuota del polvo en AAP (agua altamente purificada), y se realizaron ensayos de competencia con heparina para disociar los poliplejos siGFP-PPP dentro del polvo de NIM. Posteriormente, la siGFP liberada de los poliplejos se determinó mediante un ensayo SYBR@ gold modificado [1], mientras que la concentración de PPP se determinó mediante un ensayo TNBS [2]. En primer lugar, el lote de polvo de NIM se disolvió en 2 ml de AAP en un matraz volumétrico. El siguiente procedimiento se ejecutó por triplicado: Según el contenido teórico de siGFP, se eligió un volumen para conseguir aproximadamente 0,04 µg de siGFP por muestra. Esta solución se diluyó hasta un volumen final de 150 µl por muestra con AAP en un tubo. Después, se añadieron 75 µl de una solución de 58 k UI de heparina a cada tubo para lograr la disociación completa de los poliplejos al cabo de 2 h. Esta solución se diluyó de nuevo hasta 450 µl y se distribuyó en una placa blanca de 96 pocillos (placa de micropocillos Thermo Scientific™ BioLite, Thermo Scientific GmbH, Schwerte, Alemania) por triplicado de 100 µl cada uno. Para la cuantificación de siGFP, se añadieron 30 µl de una solución de 4 × SYBR® gold a cada pocillo y se incubaron durante 10 min en la oscuridad a temperatura ambiente. La fluorescencia de cada muestra se cuantificó usando un lector de microplacas multimodo Synergy 2 (BioTek Instrument, Winooski, VT, EE. UU.) a una longitud de onda de excitación de 485/20 nm y una longitud de onda de emisión de 520/20 nm y se comparó con una curva patrón recién preparada de siGFP libre incubada con colorante SYBR@ gold. Para la cuantificación de la PPP, 100 µl de solución disuelta del lote en 2 ml de tampón de bórax a 0,1 M (bórax de sodio decahidratado, Sigma Aldrich, Alemania) se incubaron con 30 µl de solución de TNBS a 3 mM por triplicado y se determinó la absorbancia a 405 nm tras 1 h de incubación usando un lector de microplacas multimodo Synergy 2 (BioTek Instrument, Winooski, VT, EE. UU.). La absorbancia medida se comparó con una curva patrón recién preparada de PPP libre incubada con reactivo TNBS. Para verificar cada ensayo de cuantificación, se prepararon nuevos patrones internos y se analizaron en paralelo. Estos patrones consistían en siGFP y PPP de cantidades conocidas que se elegían según la cantidad teórica de siGFP o PPP que se analizaba en la muestra, respectivamente. Estos fueron de 0,04 µg de siGFP por pocillo para la cuantificación del ácido nucleico y de 0,48 a 1,2 µg de PPP para la cuantificación del polímero. Las mediciones con desviaciones inferiores al 10 % del patrón interno se consideraron igualmente precisas y se tuvieron en cuenta para análisis posteriores.

[0105] El análisis de los polvos secados por pulverización después del secado adicional reveló que, durante el proceso de secado por pulverización, se perdieron alrededor de un 10 % del ARNip y del polímero, como se muestra en la Figura 12. Las pérdidas correspondientes respaldan la estabilidad de los poliplejos durante el proceso de secado por pulverización y confirman que no se pierde material adicional durante la etapa de secado adicional.

[0106] El contenido de agua residual del polvo de NIM tras el secado por pulverización se determinó mediante medición coulombimétrica usando un titulador de Karl Fischer Aqua 40.00 con el *software* correspondiente de Analytik Jena AG (Jena, Alemania) como se muestra en la Figura 13. Las muestras (aprox. 15 mg) se cargaron en viales 2R, se colocaron en la cámara de calentamiento y se midieron a 100 °C hasta que la deriva de medición alcanzó la deriva inicial $\leq +2$ µg/min o hasta un tiempo de medición final de 10 min. La deriva inicial se estableció tras aproximadamente 1 h de equilibrio mostrando una tasa inferior a 10 µg/min. Se usó Hydranal Coulomat AG (Riedel-deHaën, Seelze, Alemania) como reactivo. Antes de cada sesión, el valorador se calibró con un patrón de agua al 1 %. El contenido de humedad se calculó como el % en peso de agua en relación con el peso total de la muestra.

[0107] El análisis de los polvos antes y después de la etapa de secado adicional confirmó que se conseguía una reducción estadísticamente significativa de la humedad residual mediante la etapa de secado adicional. En consecuencia, también aumentó la fracción de partículas finas (FPF) de las formulaciones de trehalosa tras la etapa de secado adicional. Es probable que se obtengan resultados similares con otros excipientes amorfos.

[0108] Esto aumenta de nuevo la fracción de partículas finas del polvo, es decir, la fracción con diámetros aerodinámicos (MMAD) inferiores a 5 µm. Basándose en este perfeccionamiento de la fracción de partículas pequeñas, se puede perfeccionar considerablemente la dosis farmacéuticamente activa del polvo.

Sumario

[0109] Resumiendo, de acuerdo con la invención, el secado por pulverización por encima de la temperatura de fusión del ARNip no marcado produce cambios significativos en la cantidad de ARNip recuperado tras el secado por pulverización, incluso cuando el ARNip está presente en poliplejos encapsulados en matrices de excipientes. El secado por pulverización inventivo a la temperatura de fusión o por debajo de la misma no muestra diferencias significativas con respecto a la cantidad recuperada y la longitud de pares de bases. Adicionalmente, se descubrió sorprendentemente que el material de entubación puede tener un efecto tremendo en la preparación y el procesamiento de los poliplejos secados por pulverización, ya que las interacciones entre el material de entubación y el ARNip parecen producirse a gran escala.

[0110] Se demostró que el secado por pulverización no afectaba al tamaño del poliplejo ni al PDI, independientemente de los diferentes excipientes y de su concentración usada en este estudio. Esto también se demostró en el caso de la integridad del ARNip. El análisis cuantitativo reveló pérdidas significativas de siGFP y PPP tras el secado por pulverización cuando se formuló con manitol, representante de las sustancias cristalinas. Sin embargo, no se observaron cambios en cuanto a la recuperación de ambos componentes del poliplejo cuando se

secaron por pulverización con trehalosa, la matriz clásica usada para las micropartículas amorfas. Por lo tanto, se cree que para las propiedades de las nanopartículas las sustancias amorfas son cruciales para minimizar las pérdidas durante el procesamiento.

5 **[0111]** Una etapa de secado adicional presenta efectos positivos sobre el polvo secado por pulverización sin causar un aumento significativo de las pérdidas de ARNip. El polvo resultante muestra una disminución del contenido de humedad residual y presenta un perfeccionamiento de las características de las micropartículas sin disminuir la estabilidad de las nanopartículas.

10 **[0112]** En cuanto a las características de las micropartículas, las formulaciones de manitol superaron significativamente a las de trehalosa en cuanto a las características de las partículas. Debido a la estructura cristalina y a la posterior menor humedad residual, las partículas de manitol presentaban medianas de los tamaños geométricos más pequeñas y mostraban características aerodinámicas favorables.

15 **[0113]** Para el análisis *in vitro*, ambas formulaciones mostraron una regulación por disminución eficaz de la GFP en una línea celular que expresaba eGFP, lo que indica una bioactividad conservada con todas las formulaciones sometidas a ensayo. Estos hallazgos se trasladaron a los linfocitos T CD4+ primarios, que desempeñan un papel central en la patogénesis de enfermedades inflamatorias tales como el asma, en las que puede observarse una regulación por aumento de GATA3. Se demostró que el secado por pulverización de los polipéptidos no tenía ningún efecto negativo sobre la eficacia cuando se formulaban con manitol, y se consiguió una transfección satisfactoria de linfocitos T primarios *ex vivo* con la formulación de manitol secado por pulverización para inhalación de polvo seco, como reflejaba el silenciamiento de GATA3 eficaz y específico de secuencia.

20

[0114] Es una realización ventajosa de la invención actual combinar las propiedades beneficiosas de las partículas cristalinas y amorfas para la estabilización a través de la matriz amorfa y las características óptimas de las micropartículas a través del material cristalino.

25

[0115] Ejemplos y realizaciones a base de suspensiones acuosas que comprenden nanopartículas lipídicas:

30 Características de las nanopartículas

[0116] Además del calor, el secado por pulverización ejerce fuerzas de cizallamiento sobre los sistemas NPL-ARNip y podrían fundir, desensamblar, destruir o fusionar las NPL. Por consiguiente, se realizaron mediciones de DLS antes y después del secado por pulverización para visualizar cualquier posible efecto. Por lo tanto, se disolvieron micropartículas en AAP para la redispersión de NPL para imitar la impactación y la disolución del excipiente de la matriz en el pulmón. Como se demostró en la Figura 14, los valores medios Z de las NPL recién preparadas y redispersadas no difieren entre sí desde el punto de vista estadístico. Además, no se observaron diferencias en el PDI. Sin embargo, se reconocieron altos valores de PDI que podrían explicarse en cierta medida por los monómeros de azúcar/alditol. Weinbuch *et al.* demostró que los monómeros de azúcar y alditol son visibles en soluciones muy concentradas. [61] Resumiendo, el tamaño y la distribución de las NPL no se vieron afectados por el secado por pulverización dentro de cada formulación.

35

40

Características de las micropartículas

45 **[0117]** El suministro pulmonar a través de formulación de polvo seco requiere una humedad residual baja para evitar procesos de agregación. Aunque ya se ha considerado anteriormente que la humedad residual puede actuar como plastificante estabilizando las NPL durante el proceso de secado por pulverización, no obstante, podría provocar la agregación de micropartículas y ser una fuente de inestabilidad microbiológica y de contaminación de la ribonucleasa. Por lo tanto, el contenido de agua de todas las formulaciones se midió mediante titulación de Karl Fischer. Como se refleja en la Tabla 3, el almacenamiento de los polvos en el frigorífico durante 8 semanas tras el secado a bajas temperaturas (60° u 80 °C) pareció provocar un aumento de la humedad residual. Para todas las demás formulaciones, independientemente de la carga de la NPL y de la temperatura de secado, se observó aproximadamente un 4 % de humedad residual.

50

Activo en NPL (%)	Nombre	Masa (g) (incl. excipientes)	Rendimiento (g/g)	Residualidad (%)
5	NPL neutr 80 °C	160,36	67,3	6,84 (almacenado durante 6 semanas en el refrigerador)
5	NPL neutr 80 °C	157,25	62,9	7,28 (almacenado durante 8 semanas en el refrigerador)
5	NPL neutr 100 °C	159,40	63,8	4,21
10	NPL neutr 120 °C	184,15	73,5	3,21
10	NPL (+) 80 °C	155,66	62,3	4,24
10	NPL (+) 100 °C	166,75	66,7	4,46
10	NPL (+) 120 °C	146,61	58,6	3,34
10	NPL (-) 80 °C	183,88	73,6	4,44
10	NPL (-) 100 °C	178,75	71,5	3,38

Tabla 3) Humedad residual de las NPL secadas por pulverización con lactosa a 5 % p/v como excipiente a T-En. de 60°, 80 °C, 100 °C o 120 °C, como se ha indicado, así como las masas secadas por pulverización (SP) recuperadas y el rendimiento.

5
 [0118] La lactosa suele solidificarse tras el secado por pulverización en un estado amorfo que se confirmó a través de DSC (Figura 15). Además de la naturaleza higroscópica de la lactosa, la razón de la formación de estructuras amorfas es la rápida etapa de secado, que no proporciona tiempo suficiente para que las moléculas de lactosa se dispongan dentro de una estructura ordenada con la posterior nucleación y crecimiento de cristales, confirmado por una temperatura de transición vítrea en torno a 120 °C. [62] Todas las formulaciones de lactosa mostraron transiciones vítreas a temperaturas entre 45 y 56 °C correspondientes a su contenido de humedad residual (Figura 15 (DSC lactosa) y Tabla 3). Esta temperatura (Tg) es importante para predecir la estabilidad durante el almacenamiento, ya que las formas sólidas amorfas son termodinámicamente inestables y tienden a cristalizar si se almacenan cerca o por encima de la Tg. [63] El estado amorfo de la formulación es favorable para la conservación de las NPL. Por consiguiente, para conservar estos productos a temperatura ambiente o en el frigorífico durante más tiempo, son necesarios valores de Tg elevados. Sin embargo, esto está estrechamente relacionado con el contenido de agua: cuanto mayor sea la humedad residual, menor será la Tg. [64] También, con un menor contenido de humedad residual es menos probable que se produzcan procesos de degradación. [64] Por lo tanto, es de gran interés disminuir aún más la cantidad de humedad residual en las formulaciones de trehalosa para evitar los procesos de nucleación y degradación a lo largo del tiempo y para mantener el estado amorfo de la formulación. Aunque aún no se ha investigado detalladamente el impacto del almacenamiento sobre la calidad (tamaño, PDI) y la cantidad de las NPL, estos aspectos se están investigando actualmente en un esquema mayor de optimización de la formulación y de los parámetros del proceso. En comparación, en la figura 16, el manitol presenta una estructura cristalina con temperaturas de inicio de 164-166 °C.

25 Rendimiento *in vitro*

[0119] Para el suministro de ARNip es fundamental mantener la bioactividad de la molécula durante todo el proceso de secado por pulverización y almacenamiento. Por consiguiente, se reconstituyó el polvo secado por pulverización y se transfectaron células H1299 que expresan proteína de fluorescencia verde mejorada con las NPL redispersadas. A modo de comparación, se usaron NPL recién preparadas y con diferentes cargas (neutra, negativa y positiva) para establecer el valor inicial de la máxima eficacia de silenciamiento génico con NPL. Las células se transfectaron con ARNip a 1 µg/ml, lo que equivale a siGFP o ARNip de control desordenado a 55,7 nM. En todos los casos, las NPL cargadas con ARNip contra la GFP redujeron significativamente la expresión de GFP (Figura 18). Las NPL usadas en la formulación *in vitro* estándar redispersadas en el medio de cultivo celular mostraron una regulación por disminución muy fuerte observada en los tres grupos, que es >90 % en reducción relativa (en comparación con las NPL con siNC, que contienen una secuencia de ARNip de control negativo).

[0120] Como se demostró en la Figura 17, las NPL formadas por siGFP silenciaron significativamente la expresión de GFP en comparación con las NPL cargadas con un ARNip de control desordenado (ARNcd). De forma importante, todas las NPL secadas por pulverización (SP) funcionaron al menos tan bien como sus homólogas recién preparadas, como se muestra en la Figura 18. Este es el caso de las formulaciones con lactosa al 5 % y manitol al 5 % (Figura 19).

[0121] En la siguiente etapa, los polvos obtenidos del secado por pulverización de las NPL en manitol al 5 % o lactosa al 5 % se redispersaron en AAP para obtener NPL con 1 µg de ARNip o 0,5 µg de ARNip en 100 µl de polvo redispersado, y las células se transfectaron con ARNip a 1 µg/ml, equivalente a ARNip a 55,7 nM. En comparación, las células no se trataron (control del medio), se trataron solo con azúcar (alcohol) (medio + lactosa o manitol al 5 %), se trataron con ARNip libre, NPL recién preparadas usando la formulación Onpattro™, o con NPL usando la formulación Onpattro™ secadas por pulverización a 100 °C en lactosa (L) o manitol al 5 %.

[0122] A modo de comparación, las otras formulaciones que contenían también NPL positivas y negativas se secaron por pulverización y se sometieron a ensayo a diferentes concentraciones. Como se muestra en la Figura 18, no se observaron diferencias significativas entre las formulaciones que contenían la misma concentración de ARNip, independientemente de la temperatura de secado por pulverización (NPL neutras a ARNip a 1 µg/ml, secadas por pulverización a 60°, 80° o 100 °C). Además, no se observaron diferencias en cuanto a la carga de las nanopartículas cuando se utilizó la misma concentración de ARNip para las NPL positivas y negativas (ARNip a 0,5 µg/ml a 80 °C). Solo las NPL secadas por pulverización a 100 °C mostraron ligeras diferencias entre las NPL positivas, que a 0,5 µg/ml eran más eficaces que las NPL negativas a 0,5 µg/ml o las NPL neutras a 1 µg/ml. Como se muestra en la Figura 19, las NPL secadas por pulverización en manitol muestran los mismos resultados que las secadas por pulverización en lactosa.

Conclusiones y perspectivas

[0123] Resumiendo, se demostró que el secado por pulverización de las NPL cargadas con ARNip a una T-Sal. de 72 °C o inferior en lactosa al 5 % permite conservar el ARNip y la actividad de las NPL tras el secado por pulverización y la redispersión.

[0124] Se demostró que el secado por pulverización no afectaba al tamaño de las NPL ni al PDI. En cuanto a las características del polvo, las formulaciones de lactosa contenían un contenido de humedad residual de aproximadamente el 4 %, independientemente de la temperatura de secado por pulverización aplicada.

[0125] Para el análisis *in vitro*, las tres formulaciones mostraron una regulación por disminución eficaz de la GFP en una línea celular que expresaba eGFP, lo que indica una bioactividad conservada con todas las formulaciones sometidas a ensayo. La eficacia no dependió de la temperatura de secado del aerosol ni de la formulación, sino simplemente de la concentración de ARNip y del uso de lactosa o manitol al 5 % como excipientes. Sin embargo, una diferencia entre el presente enfoque y el método elegido por TranslateBio Inc (ahora Sanofi) es el porcentaje en peso del ARN en el polvo. Mientras que Karve *et al.* usaron una concentración de ARN del 0,133 % [65], mientras nosotros observamos que un mayor exceso de excipiente puede proteger las NPL de forma más eficaz. El método descrito puede usarse para un intervalo de 0,001-0,02 % p/p de ARN en el producto final en polvo. Este porcentaje de ARN es una función de los contenidos sólidos en la dispersión de alimentación para el secado por pulverización, ya que >90 % del agua se evapora durante el procedimiento de secado por pulverización.

Agradecimientos

[0126] Este proyecto ha sido financiado por el Consejo Europeo de Investigación (ERC) en el marco del programa de investigación e innovación Horizon 2020 de la Unión Europea (Acuerdo de subvención n.º StG-2014-637830).

Referencias bibliográficas

[0127]

- [1] S. Weber, A. Zimmer, J. Pardeike, Solid Lipid Nanoparticles (SLN) and Nanostructured Lipid Carriers (NLC) for pulmonary application: a review of the state of the art, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 86 (2014) 7-22.
- [2] A. Ray, A. Mandal, A.K. Mitra, Recent Patents in Pulmonary Delivery of Macromolecules, *Recent Pat Drug Deliv Formul*, 9 (2015) 225-236.
- [3] G.K. Crompton, Dry powder inhalers: advantages and limitations, *J. Aerosol Med.*, 4 (1991) 151-156.
- [4] P. Hematti, E.G. Schmuck, J.A. Kink, A.N. Raval, Generation of therapeutic cells using extracellular components of target organs, in, US Patent US20180282698A1 2018.
- [5] G.J. Hannon, RNA interference, *Nature*, 418 (2002) 244-251.
- [6] H.J. Kim, A. Kim, K. Miyata, K. Kataoka, Recent progress in development of siRNA delivery vehicles for cancer therapy, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 104 (2016) 61-77.
- [7] S.S. Titze-de-Almeida, P.R.P. Brandao, I. Faber, R. Titze-de-Almeida, Leading RNA Interference Therapeutics Part 1: Silencing Hereditary Transthyretin Amyloidosis, with a Focus on Patisiran, *Mol. Diagn. Ther.*, (2019) 1-11.
- [8] P. de Paula Brandão, S. Titze-de-Almeida, R. Titze-de-Almeida, Leading RNA Interference Therapeutics Part 2: Silencing Delta-Aminolevulinic Acid Synthase 1, with a Focus on Givosiran, *Mol. Diagn. Ther.*, (2019) 1-8.
- [9] D.P. Feldmann, Y. Xie, S.K. Jones, D. Yu, A. Moszczynska, O.M. Merkel, The impact of microfluidic mixing of triblock micelleplexes on *in vitro in vivo* gene silencing and intracellular trafficking, *Nanotechnology*, 28 (2017) 224001.
- [10] S.K. Jones, V. Lizzio, O.M. Merkel, Folate Receptor Targeted Delivery of siRNA and Paclitaxel to Ovarian Cancer Cells via Folate Conjugated Triblock Copolymer to Overcome TLR4 Driven Chemotherapy Resistance, *Biomacromolecules*, 17 (2016) 76-87.
- [11] T. Endres, M. Zheng, M. Beck-Broichsitter, T. Kissel, Lyophilised ready-to-use formulations of PEG-PCL-PEI nano-carriers for siRNA delivery, *Int. J. Pharm.*, 428 (2012) 121-124.
- [12] T.W.M. Keil, D.P. Feldmann, G. Costabile, Q. Zhong, S. da Rocha, O.M. Merkel, Characterization of spray dried powders with nucleic acid-containing PEI nanoparticles, *Eur J Pharm Biopharm*, (2019).

- [13] K. Cal, K. Sollohub, Spray drying technique. I: Hardware and process parameters, *J. Pharm. Sci.*, 99 (2010) 575-586.
- [14] T. Okuda, M. Morishita, K. Mizutani, A. Shibayama, M. Okazaki, H. Okamoto, Development of spray-freeze-dried siRNA/PEI powder for inhalation with high aerosol performance and strong pulmonary gene silencing activity, *J. Control. Release*, 279 (2018) 99-113.
- [15] M. Cardenas, A. Braem, T. Nylander, B. Lindman, DNA compaction at hydrophobic surfaces induced by a cationic amphiphile, *Langmuir*, 19 (2003) 7712-7718.
- [16] J. Horn, J. Schanda, W. Friess, Impact of fast and conservative freeze-drying on product quality of protein-mannitol-sucrose-glycerol lyophilizates, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 127 (2018) 342-354.
- [17] M.T. Cicerone, M.J. Pikal, K.K. Qian, Stabilization of proteins in solid form, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 93 (2015) 14-24.
- [18] United-States-Pharmacopoeial-Convention, Particle Size - Aerodynamic Size Distribution, en: 601 Aerosols, Nasal Sprays, Metered-Dose Inhalers, and Dry Powder Inhalers, USP 35, 2012, págs. 232-252.
- [19] European-Pharmacopoeia-Commission, Aerodynamic Assessment of Fine Particles, en: 2.9.18 Preparations for Inhalation, *Ph.Eur.* 9,0, 2017, págs. 440-454.
- [20] W. Liang, M.Y. Chow, P.N. Lau, Q.T. Zhou, P.C. Kwok, G.P. Leung, A.J. Mason, H.K. Chan, L.L. Poon, J.K. Lam, Inhalable dry powder formulations of siRNA and pH-responsive peptides with antiviral activity against H1N1 influenza virus, *Mol. Pharmaceutics*, 12 (2015) 910-921.
- [21] W.L. Liang, M.Y.T. Chow, S.F. Chow, H.K. Chan, P.C.L. Kwok, J.K.W. Lam, Using two-fluid nozzle for spray freeze drying to produce porous powder formulation of naked siRNA for inhalation, *Int. J. Pharm.*, 552 (2018) 67-75.
- [22] J. Wu, L. Wu, F. Wan, J. Rantanen, D. Cun, M. Yang, Effect of thermal and shear stresses in the spray drying process on the stability of siRNA dry powders, *Int. J. Pharm.*, 566 (2019) 32-39.
- [23] J. Schulze, S. Kuhn, S. Hendriks, M. Schulz-Siegmund, T. Polte, A. Aigner, Spray-Dried Nanoparticle-in-Microparticle Delivery Systems (NiMDS) for Gene Delivery, Comprising Polyethylenimine (PEI)-Based Nanoparticles in a Poly(Vinyl Alcohol) Matrix, *Small*, 14 (2018) e1701810.
- [24] L. Liu, M. Zheng, D. Librizzi, T. Renette, O.M. Merkel, T. Kissel, Efficient and Tumor Targeted siRNA Delivery by Polyethylenimine-graft-polycaprolactone-block-poly (ethylene glycol)-folate (PEI-PCL-PEG-Fol), *Molecular pharmaceutics*, 13 (2015) 134-143.
- [24a] Y. Xie, N. Kim, V. Nadithe, D. Schalk, A. Thakur, A. Kilic, D. Bassett, L. Lum, O. Merkel, Targeted delivery of siRNA to activated T cells via transferrin-polyethylenimine (Tf-PEI) as a potential therapy of asthma, *Journal of Controlled Release*, 229 (2016) 120-129
- [25] HORIBA, Understanding the Chi Square and R Parameter - Calculations in the LA-950 Software, https://www.horiba.com/fileadmin/uploads/Scientific/Documents/PSA/TN1_53.pdf, 4.
- [26] S. Claus, C. Weiler, J. Schiewe, W. Friess, Optimization of the fine particle fraction of a lyophilized lysozyme formulation for dry powder inhalation, *Pharm. Res.*, 30 (2013) 1698-1713.
- [27] R. Kandil, Y. Xie, R. Heermann, L. Isert, K. Jung, A. Mehta, O.M. Merkel, Coming in and Finding Out: Blending Receptor-Targeted Delivery and Efficient Endosomal Escape in a Novel Bio-Responsive siRNA Delivery System for Gene Knockdown in Pulmonary T Cells, *Advanced therapeutics*, 2 (2019) 1900047.
- [28] Y.R. Xie, N.H. Kim, V. Nadithe, D. Schalk, A. Thakur, A. Kilic, L.G. Lum, D.J.P. Bassett, O.M. Merkel, Targeted delivery of siRNA to activated T cells via transferrin-polyethylenimine (Tf-PEI) as a potential therapy of asthma, *J. Control. Release*, 229 (2016) 120-129.
- [29] Büchi-Labortechnik-AG, Training Papers Spray Drying, https://static1.buchi.com/sites/default/files/downloads/Set_3_Training_Papers_Spray_Drying_en_01.pdf?996b2db24007502bd69c913b675467cfc63880ba, (1997 - 2002).
- [30] M. Terrazas, E.T. Kool, RNA major groove modifications improve siRNA stability and biological activity, *Nucleic Acids Res.*, 37 (2009) 346-353.
- [31] D. Weinbuch, J.K. Cheung, J. Ketelaars, V. Filipe, A. Hawe, J. den Engelsman, W. Jiskoot, Nanoparticulate Impurities in Pharmaceutical-Grade Sugars and their Interference with Light Scattering-Based Analysis of Protein Formulations, *Pharm. Res.*, 32 (2015) 2419-2427.
- [32] N.K. Jain, I. Roy, Effect of trehalose on protein structure, *Protein Sci.*, 18 (2009) 24-36.
- [33] I. Vollrath, W. Friess, A. Freitag, A. Hawe, G. Winter, Comparison of ice fog methods and monitoring of controlled nucleation success after freeze-drying, *Int. J. Pharm.*, 558 (2019) 18-28.
- [34] J.H. Gitter, R. Geidobler, I. Presser, G. Winter, A comparison of controlled ice nucleation techniques for freeze-drying of a therapeutic antibody, *J. Pharm. Sci.*, 107 (2018) 2748-2754.
- [35] J.H. Crowe, L.M. Crowe, D. Chapman, Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose, *Science*, 223 (1984) 701-703.
- [36] J.H. Crowe, F.A. Hoekstra, L.M. Crowe, Anhydrobiosis, *Annu. Rev. Physiol.*, 54 (1992) 579-599.
- [37] K. Izutsu, S. Kojima, Excipient crystallinity and its protein-structure-stabilizing effect during freeze-drying, *Journal of pharmacy and pharmacology*, 54 (2002) 1033-1039.
- [38] M. Adler, G. Lee, Stability and surface activity of lactate dehydrogenase in spray-dried trehalose, *J. Pharm. Sci.*, 88 (1999) 199-208.
- [39] M. Maury, K. Murphy, S. Kumar, L. Shi, G. Lee, Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 59 (2005) 565-573.
- [40] N.Y. Chew, H.-K. Chan, Influence of particle size, air flow, and inhaler device on the dispersion of mannitol powders as aerosols, *Pharm. Res.*, 16 (1999) 1098-1103.

- [41] Y.Y. Lee, J.X. Wu, M. Yang, P.M. Young, F. van den Berg, J. Rantanen, Particle size dependence of polymorphism in spray-dried mannitol, *Eur. J. Pharm. Sci.*, 44 (2011) 41-48.
- [42] K.J. Geh, M. Hubert, G. Winter, Progress in formulation development and sterilisation of freeze-dried oligodeoxynucleotide-loaded gelatine nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 129 (2018) 10-20.
- 5 [43] E.Y. Shalaev, G. Zografi, How does residual water affect the solid-state degradation of drugs in the amorphous state?, *J. Pharm. Sci.*, 85 (1996) 1137-1141.
- [44] J.H. Gitter, R. Geidobler, I. Presser, G. Winter, Significant Drying Time Reduction Using Microwave- Assisted Freeze- Drying for a Monoclonal Antibody, *J. Pharm. Sci.*, 107 (2018) 2538-2543.
- 10 [45] L. Weng, S. Ziaei, G.D. Elliott, Effects of Water on Structure and Dynamics of Trehalose Glasses at Low Water Contents and its Relationship to Preservation Outcomes, *Sci. Rep.*, 6 (2016) 28795.
- [46] I. Gonda, A.F. Abdelkhalik, On the Calculation of Aerodynamic Diameters of Fibers, *Aerosol Sci. Technol.*, 4 (1985) 233-238.
- [47] F. Cardarelli, L. Digiacomio, C. Marchini, A. Amici, F. Salomone, G. Fiume, A. Rossetta, E. Gratton, D. Pozzi, G. Caracciolo, The intracellular trafficking mechanism of Lipofectamine-based transfection reagents and its
- 15 [48] J.S. Kim, T.J. Yoon, K.N. Yu, M.S. Noh, M. Woo, B.G. Kim, K.H. Lee, B.H. Sohn, S.B. Park, J.K. Lee, Cellular uptake of magnetic nanoparticle is mediated through energy-dependent endocytosis in A549 cells, *J. Vet. Sci.*, 7 (2006) 321-326.
- [49] Y. Liu, O. Samsonova, B. Sproat, O. Merkel, T. Kissel, Biophysical characterization of hyper-branched polyethylenimine-graft-polycaprolactone-block-mono-methoxyl-poly (ethylene glycol) copolymers (hy-PEI-PCL-mPEG) for siRNA delivery, *J. Control. Release*, 153 (2011) 262-268.
- 20 [50] A. Ray, L. Cohn, Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation, *J. Clin. Invest.*, 104 (1999) 985-993.
- [51] S.M. Hoy, Patisiran: First Global Approval, *Drugs*, 78 (2018) 1625-1631.
- 25 [52] R. Kandil, Y. Xie, R. Heermann, L. Isert, K. Jung, A. Mehta, O.M. Merkel, Coming in and Finding Out: Blending Receptor-Targeted Delivery and Efficient Endosomal Escape in a Novel Bio-Responsive siRNA Delivery System for Gene Knockdown in Pulmonary T Cells, *Adv. Ther. (Weinheim, Ger.)*, 2 (2019) 1900047.
- [53] S. Schüle, W. Frieß, K. Bechtold-Peters, P. Garidel, Conformational analysis of protein secondary structure during spray-drying of antibody/mannitol formulations, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 65 (2007) 1-9.
- 30 [54] C. Garcia-Galan, O. Barbosa, R. Fernandez-Lafuente, Stabilization of the hexameric glutamate dehydrogenase from *Escherichia coli* by cations and polyethyleneimine, *Enzyme Microb Technol*, 52 (2013) 211-217.
- [55] J. Horn, E. Tolardo, D. Fissore, W. Friess, Crystallizing amino acids as bulking agents in freeze-drying, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 132 (2018) 70-82.
- 35 [56] R.E. Johnson, C.F. Kirchhoff, H.T. Gaud, Mannitol-sucrose mixtures-versatile formulations for protein lyophilization, *J. Pharm. Sci.*, 91 (2002) 914-922.
- [57] A. Hawe, W. Friess, Physicochemical characterization of the freezing behavior of mannitol-human serum albumin formulations, *AAPS PharmSciTech*, 7 (2006) 94.
- [58] A. Akinc, M.A. Maier, M. Manoharan, K. Fitzgerald, M. Jayaraman, S. Barros, S. Ansell, X. Du, M.J. Hope, T.D. Madden, B.L. Mui, S.C. Semple, Y.K. Tam, M. Ciufolini, D. Witzigmann, J.A. Kulkarni, R. van der Meel, P.R. Cullis,
- 40 [59] J.A. Kulkarni, D. Witzigmann, S. Chen, P.R. Cullis, R. van der Meel, Lipid Nanoparticle Technology for Clinical Translation of siRNA Therapeutics, *Acc Chem Res*, 52 (2019) 2435-2444.
- [60] J.A. Kulkarni, D. Witzigmann, J. Leung, Y.Y.C. Tam, P.R. Cullis, On the role of helper lipids in lipid nanoparticle formulations of siRNA, *Nanoscale*, 11 (2019) 21733-21739.
- 45 [61] D. Weinbuch, J.K. Cheung, J. Ketelaars, V. Filipe, A. Hawe, J. den Engelsman, W. Jiskoot, Nanoparticulate Impurities in Pharmaceutical-Grade Sugars and their Interference with Light Scattering-Based Analysis of Protein Formulations, *Pharm. Res.*, 32 (2015) 2419-2427.
- [62] O.C. Chidavaenzi, G. Buckton, F. Koosha, R. Pathak, The use of thermal techniques to assess the impact of feed concentration on the amorphous content and polymorphic forms present in spray dried lactose, *International Journal of Pharmaceutics*, 159 (1997) 67-74.
- 50 [63] K.J. Geh, M. Hubert, G. Winter, Progress in formulation development and sterilisation of freeze-dried oligodeoxynucleotide-loaded gelatine nanoparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 129 (2018) 10-20.
- [64] E.Y. Shalaev, G. Zografi, How does residual water affect the solid-state degradation of drugs in the amorphous state?, *J. Pharm. Sci.*, 85 (1996) 1137-1141.
- 55 [65] S. Karve, F. DeRosa, M. Heartlein, Z. Patel, A. Sarode, Dry powder formulations for messenger rna, en: T.B. Inc (Ed.), 2019

REIVINDICACIONES

1. Método para producir polvo seco de ARNip nano-en-microencapsulado (NIM) bioactivo de alto rendimiento que comprende las etapas de:

- 5
- proporcionar una suspensión acuosa que comprende poliplejos, en particular, complejos de polielectrolitos, formados por al menos una poliamina, y/o poliamida y/o poliéster y ARNip, en donde los poliplejos están provistos de y/o encapsulados en excipientes hidrosolubles, en particular, agua altamente purificada y/o alditol y/o azúcar, o
 - 10 proporcionar una suspensión acuosa que comprende nanopartículas lipídicas formadas por al menos un lípido catiónico ionizable, un lípido auxiliar, un lípido pegilado, colesterol y ARNip, en donde las nanopartículas lipídicas están provistas de y/o encapsuladas en excipientes hidrosolubles, en particular, agua altamente purificada y/o alditol y/o azúcar;
 - secar por pulverización la suspensión acuosa usando un aparato de secado por pulverización, preferentemente un Büchi B-290, alimentando la suspensión acuosa a una boquilla atomizadora de secado por pulverización y sometiendo las gotitas atomizadas a una corriente de gas calentado de un gas portador, preferentemente aire seco y limpio, en particular, a través de una boquilla atomizadora multicomponente para la suspensión y un gas atomizador;
 - 15 - recoger un polvo seco por pulverización en un medio de acumulación del aparato de secado por pulverización

20 **caracterizado por que**

la temperatura en las proximidades de una abertura de salida que conecta una cámara de secado por pulverización con el medio de acumulación durante la alimentación de la suspensión acuosa a la boquilla se controla mediante medios de control de la temperatura para que se limite a una temperatura umbral superior que sea igual o inferior a una temperatura de fusión del respectivo ARNip no marcado, de tal manera que el polvo pueda resuspendirse en

25 agua para formar poliplejos o suspensiones de poliplejos o nanopartículas lipídicas o suspensiones de nanopartículas lipídicas que no varíen más de +/- 10 % desde su formulación inicial antes del secado por pulverización en lo que respecta al tamaño, polidispersidad y potencial zeta.

2. Método de acuerdo con la reivindicación 1,

30 **caracterizado por que,**

la temperatura umbral superior se fija en 90 °C, en particular, 80 °C, en particular, para la suspensión acuosa que comprende poliplejos.

3. Método de acuerdo con la reivindicación 1,

35 **caracterizado por que,**

la temperatura umbral superior se fija en 63 °C, especialmente 63 ± 2 °C, en particular, para la suspensión acuosa que comprende nanopartículas lipídicas.

4. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 3,

40 **caracterizado por que,**

la proporción en masa entre el ARNip y un azúcar y/o alditol está entre el 0,001 % y el 0,02 %, en particular, para la suspensión acuosa que comprende nanopartículas lipídicas.

5. Método de acuerdo con la reivindicación 4,

45 **caracterizado por que,**

la lactosa se usa como azúcar o se usa con un alditol, en particular, para la suspensión acuosa que comprende nanopartículas lipídicas.

6. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 5,

50 **caracterizado por que,**

la suspensión acuosa se alimenta a la boquilla a través de un material de entubación de alto grado, en particular, un material de entubación a base de silicio de alto grado, especialmente Pumpsil®.

7. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6,

55 **caracterizado por**

una etapa de secado adicional, en la que se alimenta un gas portador a través del aparato de secado por pulverización, especialmente la boquilla atomizadora, sin ser mezclado con suspensión acuosa y, en particular, mientras el polvo seco por pulverización ya se ha transferido al medio de acumulación.

8. Método de acuerdo con la reivindicación 7,

60 **caracterizado por que,**

la etapa adicional de secado se lleva a cabo con la temperatura en las proximidades de la boquilla de secado por pulverización que es controlada por medios de control de la temperatura para ajustarse a una temperatura umbral superior, en particular, una temperatura umbral superior de 90 °C, en particular, 80 °C para la suspensión acuosa que

65 comprende poliplejos y/o 63 °C para la suspensión acuosa que comprende nanopartículas lipídicas.

9. Método de acuerdo con la reivindicación 8,
caracterizado por que,

la etapa de secado adicional se lleva a cabo hasta alcanzar una humedad residual del polvo secado por pulverización inferior al 3 %, en particular, inferior al 2 %.

5

10. Método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 9,

caracterizado por que, como poliamina, se usa polietilenimina-injerto-policaprolactona-bloque-poli(etilenglicol) (PEI-g-PCL-b-PEG o PPP) y/o un bioconjugado de polietilenimina, especialmente polietilenimina conjugada con transferrina (Tf-PEI), y/o poliespermina.

10

11. Polvo que contiene ARNip bioactivo en forma de poliplejos, en particular, complejos de polielectrolitos, formados por al menos una poliamina, poliamida y/o poliéster y ARNip, o en forma de nanopartículas lipídicas formadas por al menos un lípido catiónico ionizable, un lípido auxiliar, un lípido pegilado, colesterol y ARNip, en donde los poliplejos y/o las nanopartículas lipídicas se encapsulan en excipientes hidrosolubles, en particular, manitol y/o trehalosa y/o lactosa, con una humedad residual inferior al 5 %, y preferentemente con diámetros aerodinámicos (MMAD) de entre 0,5 y 10 µm, preferentemente 1 y 5 µm, producido de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10

15

caracterizado por que,

el polvo puede resuspenderse en agua para formar poliplejos o suspensiones de poliplejos o nanopartículas lipídicas o suspensiones de nanopartículas lipídicas que no varían más de +/- 10 % de su formulación inicial antes del secado por pulverización en lo que respecta al tamaño, polidispersidad y potencial zeta.

20

12. Polvo de acuerdo con la reivindicación 11,

caracterizado por que

la poliamina es polietilenimina-injerto-policaprolactona-bloque-poli(etilenglicol) (PEI-g-PCL-b-PEG o PPP) y/o un bioconjugado de polietilenimina, en particular, polietilenimina conjugada con transferrina (Tf-PEI), y/o poliespermina.

25

13. Composición o mezcla en polvo que comprende al menos un polvo de acuerdo con la reivindicación 11 o 12 usado como forma farmacéutica, especialmente para suministro pulmonar.

30

14. Composición o mezcla en polvo que comprende al menos un polvo de acuerdo con la reivindicación 11 o 12, en donde el ARNip es activo para silenciar la traducción del ARN mensajero en proteínas causantes de enfermedades pulmonares.

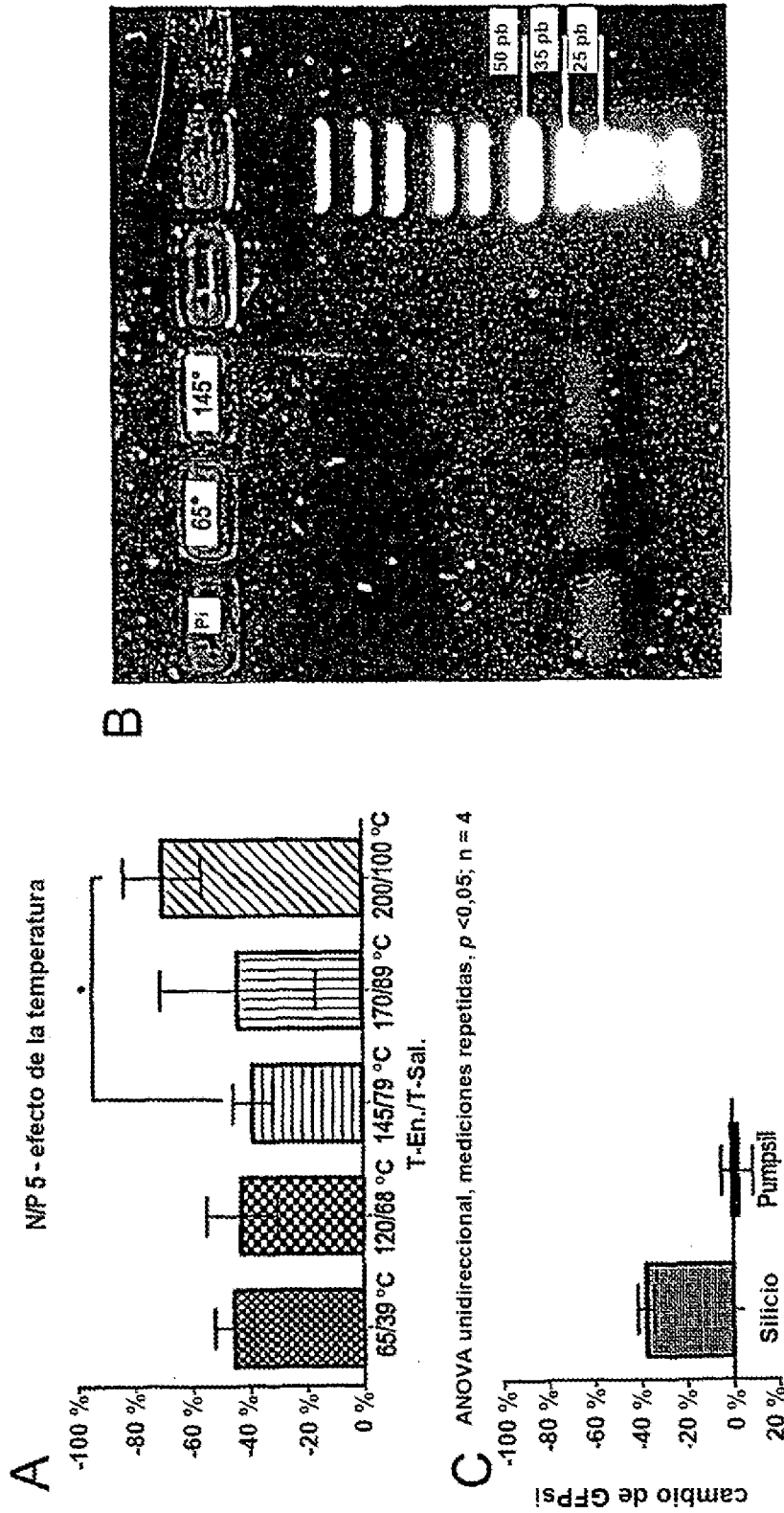


Fig. 1

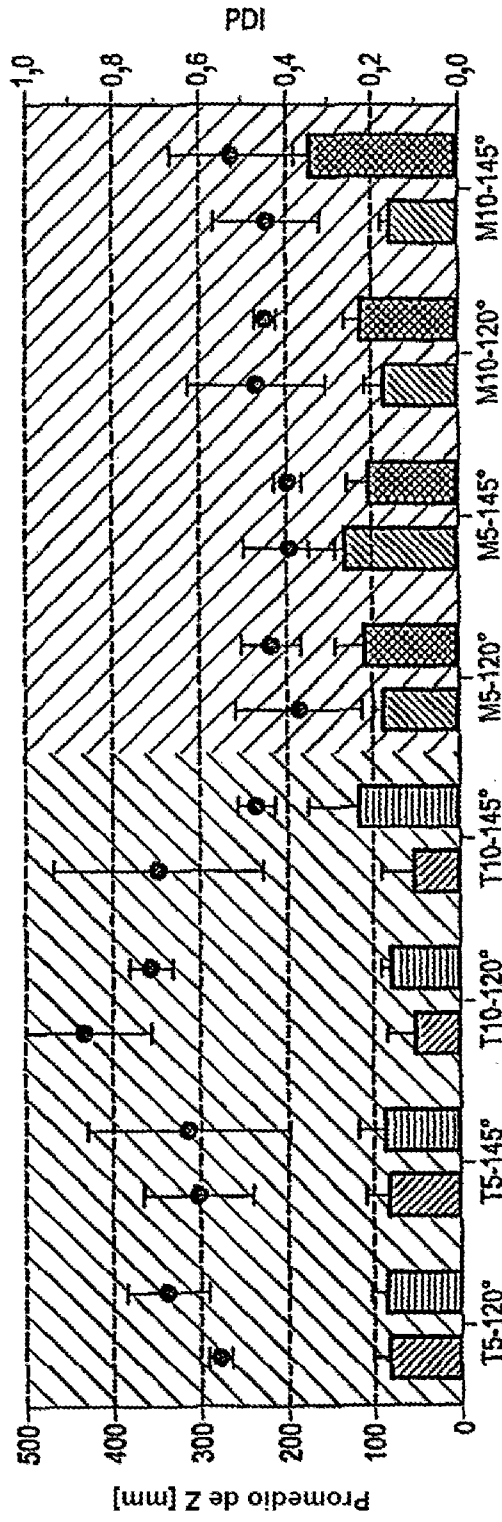


Fig. 2

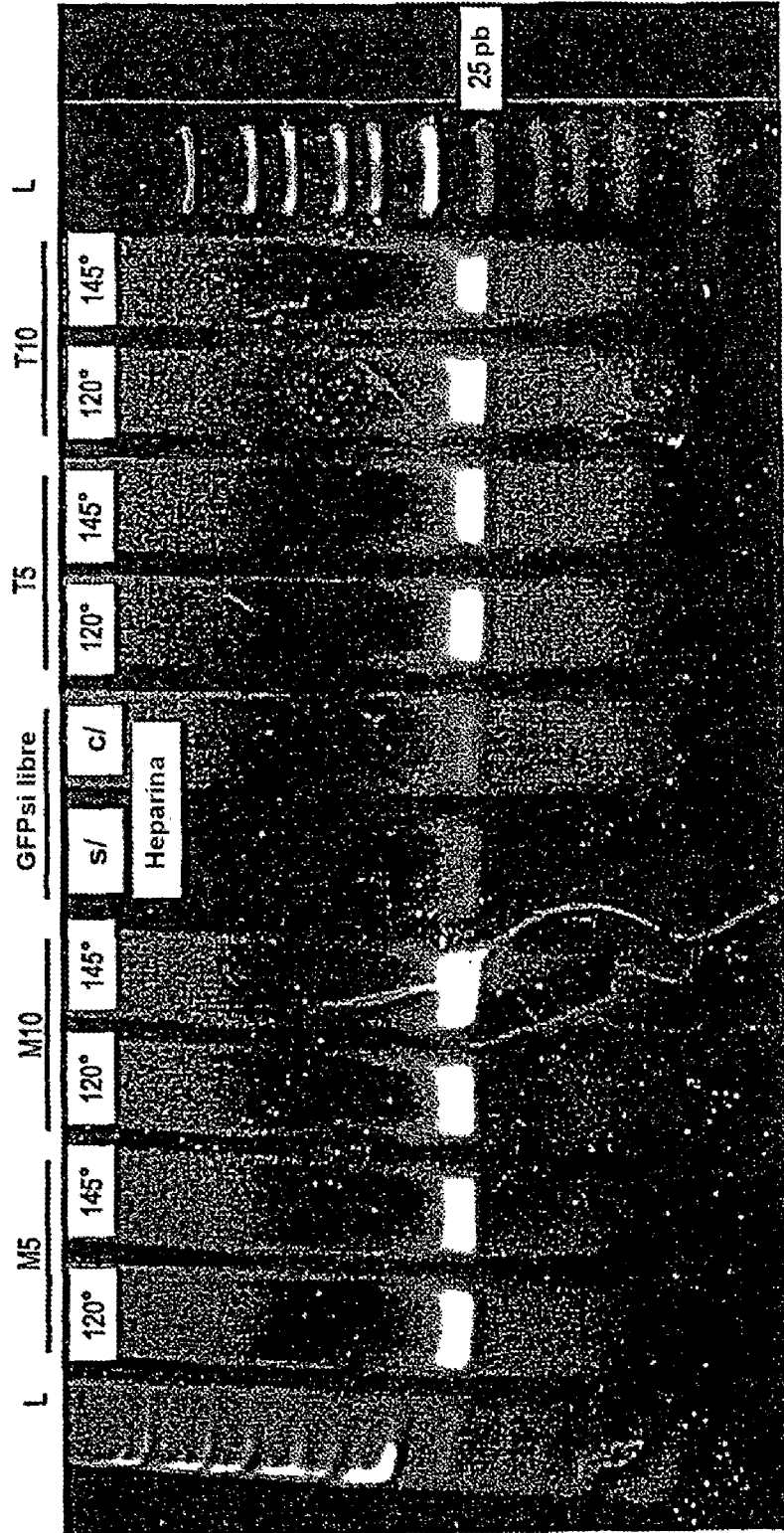


Fig. 3

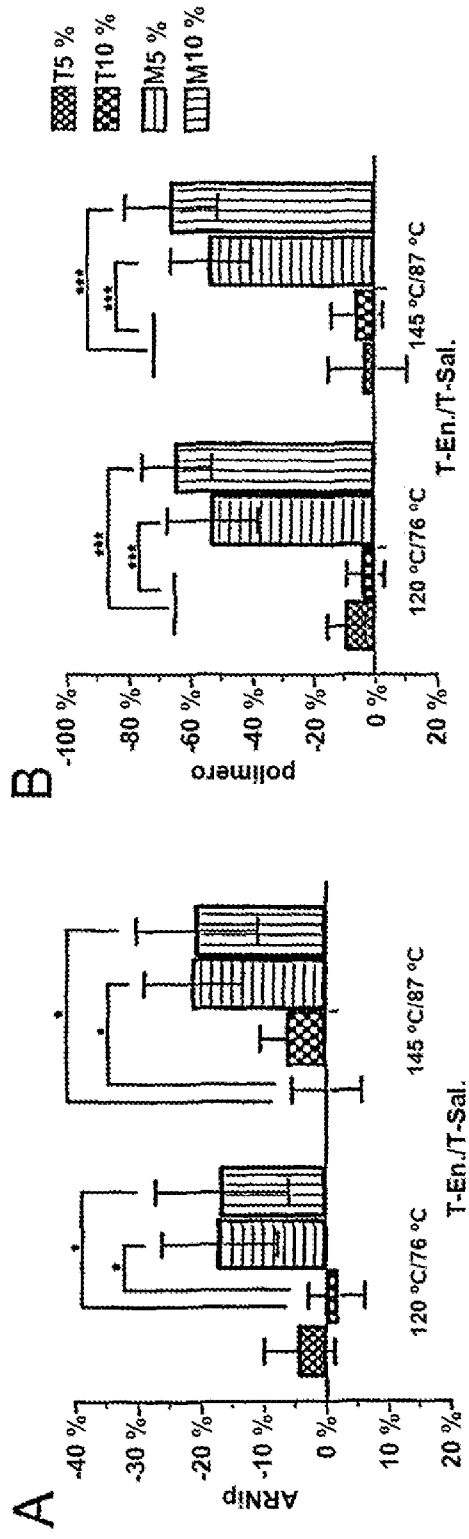


Fig. 4

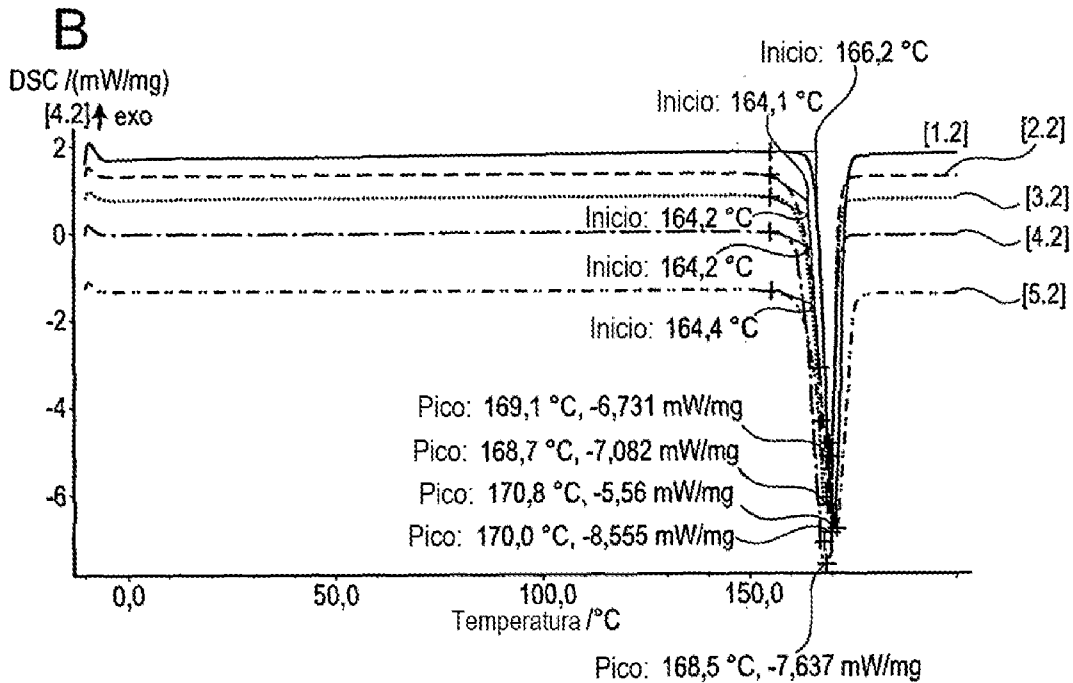
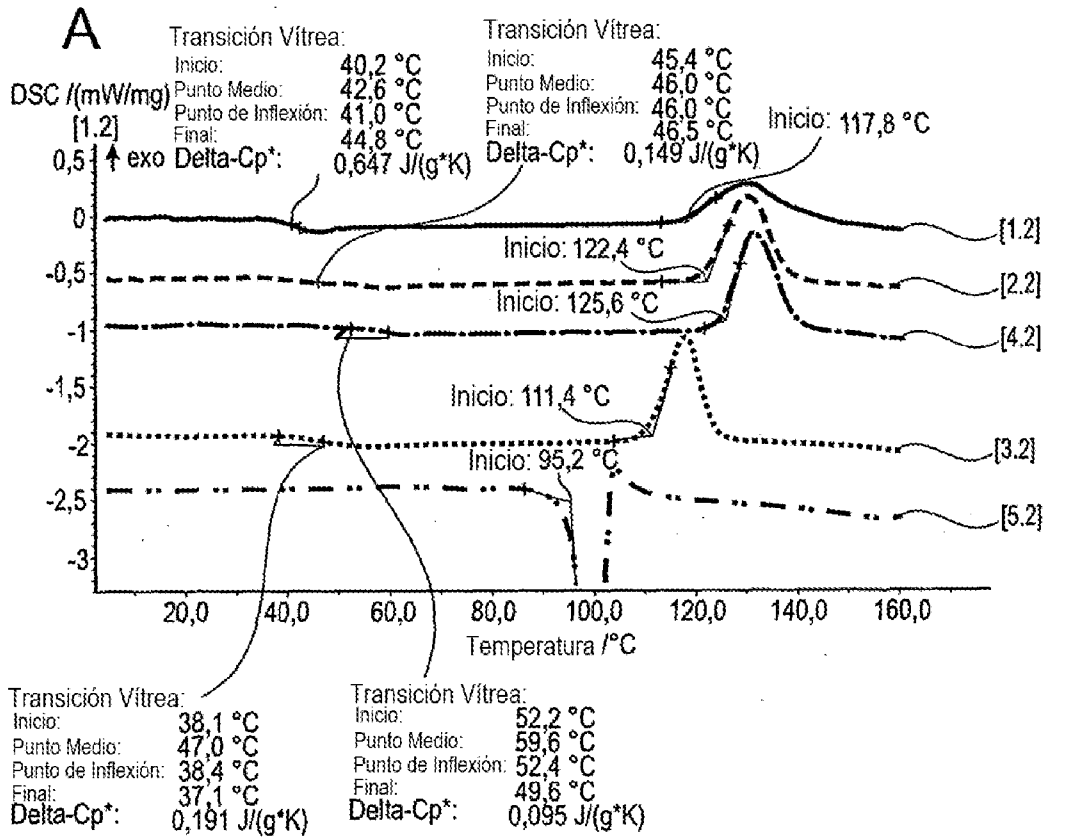


Fig. 5

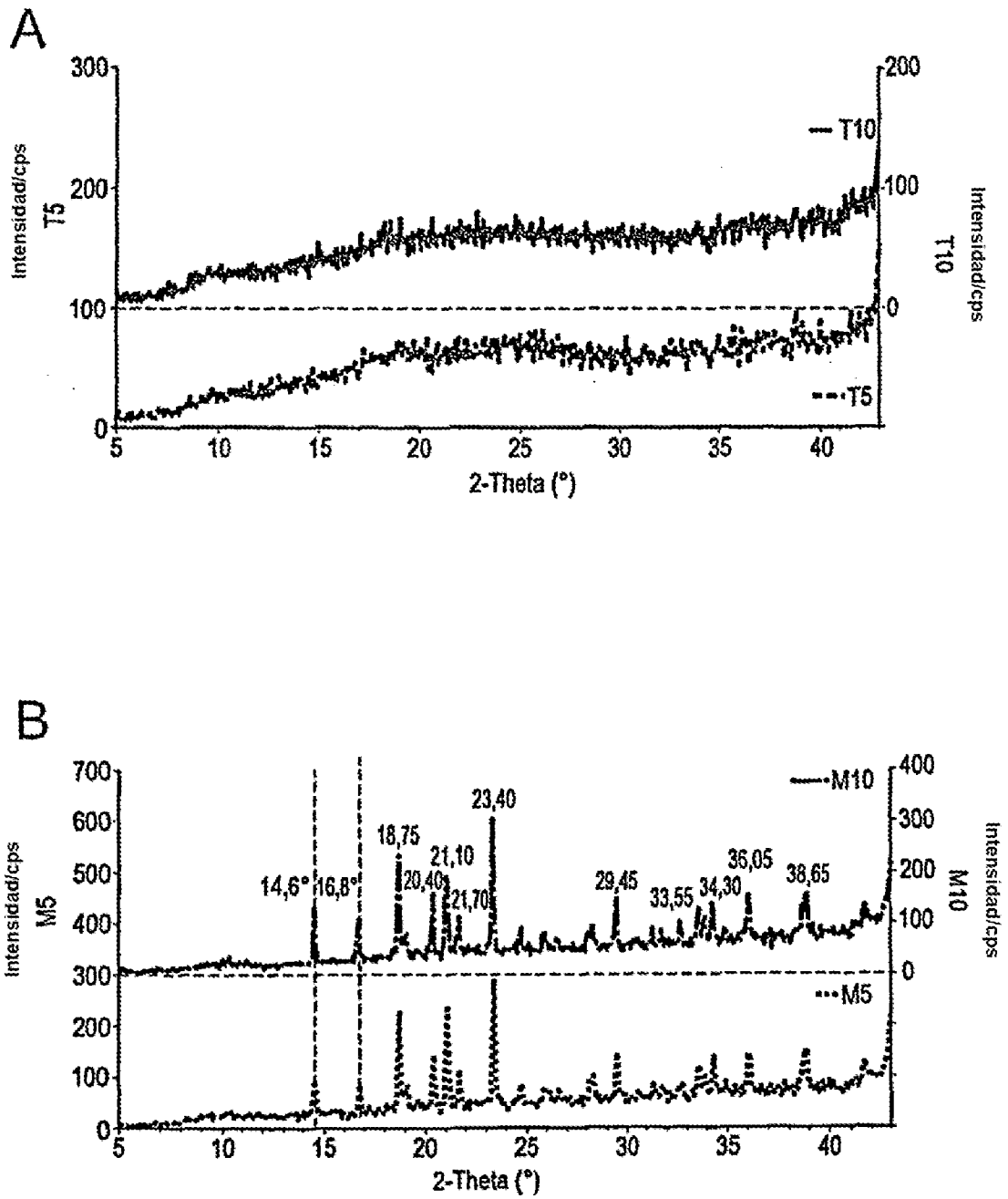


Fig. 6

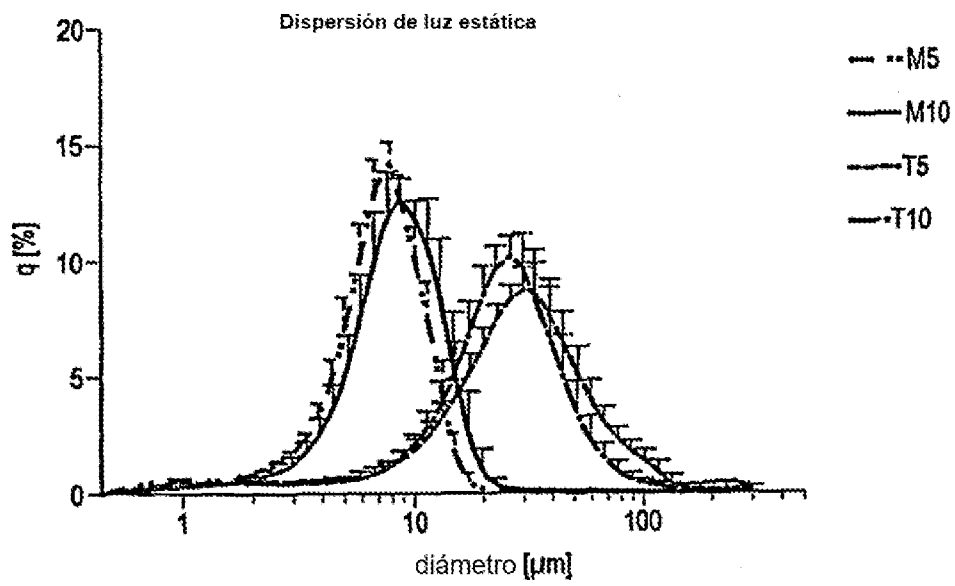


Fig. 7

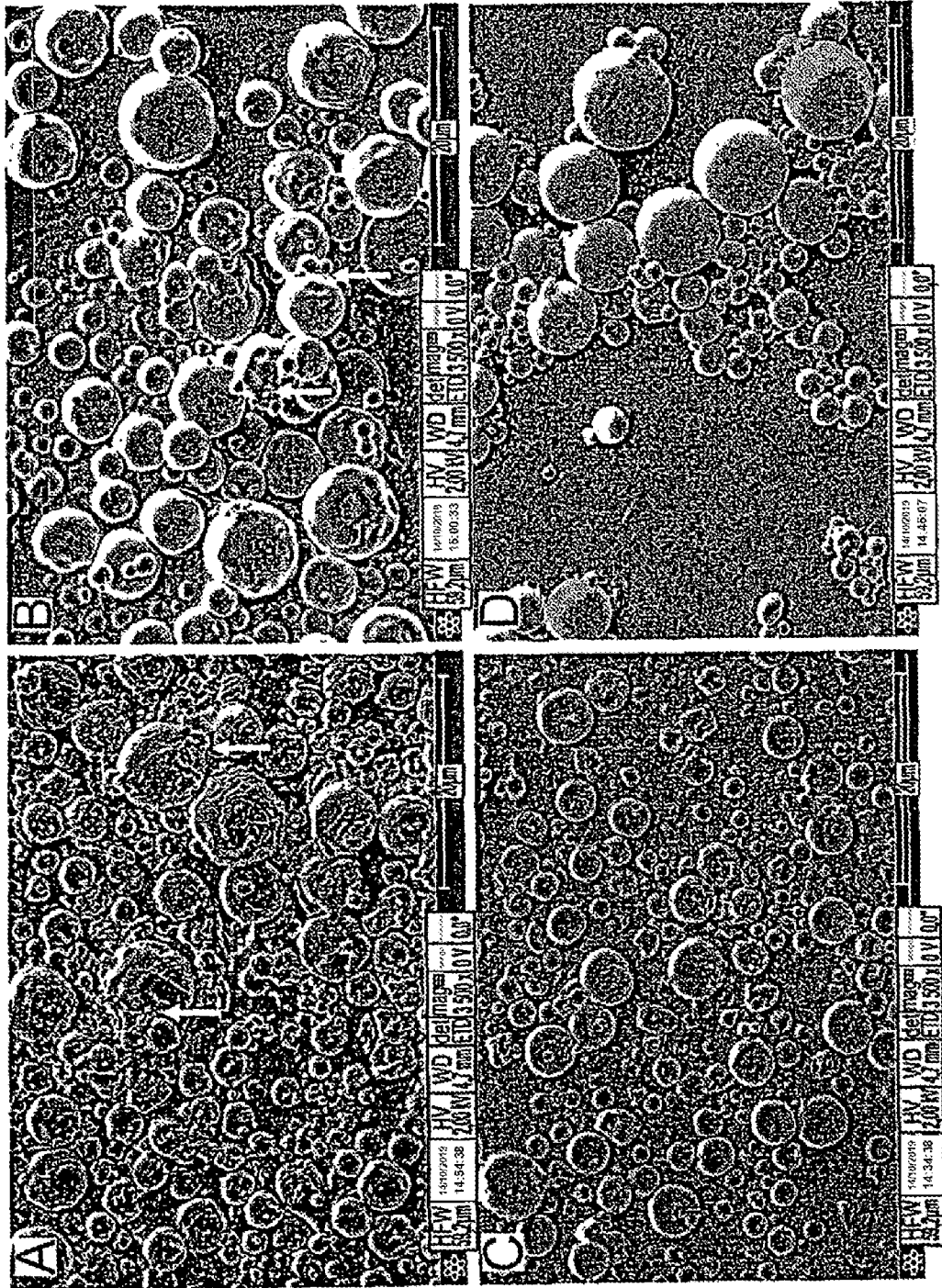


Fig. 8

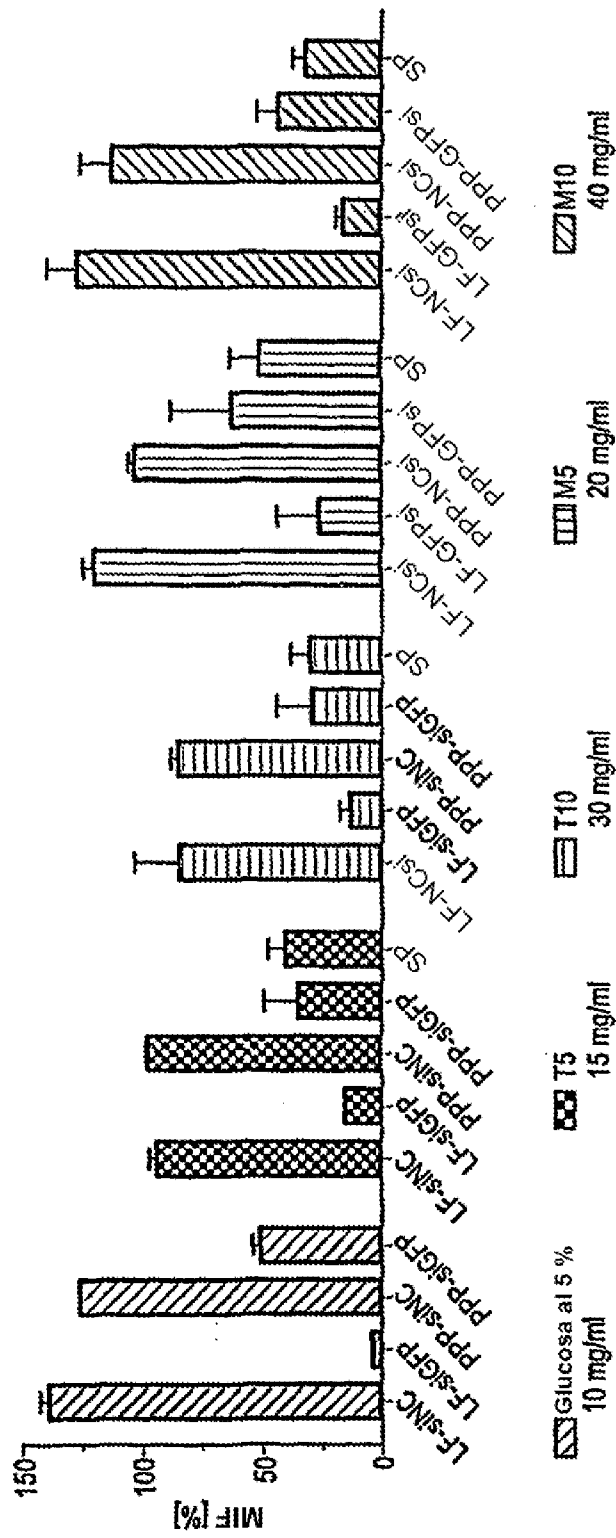


Fig. 9

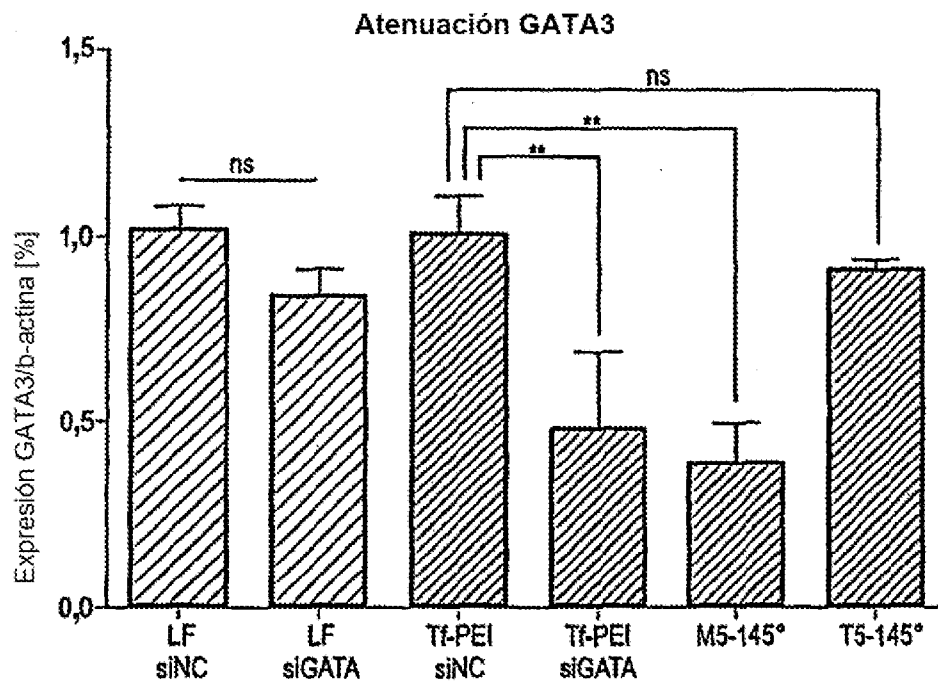


Fig. 10

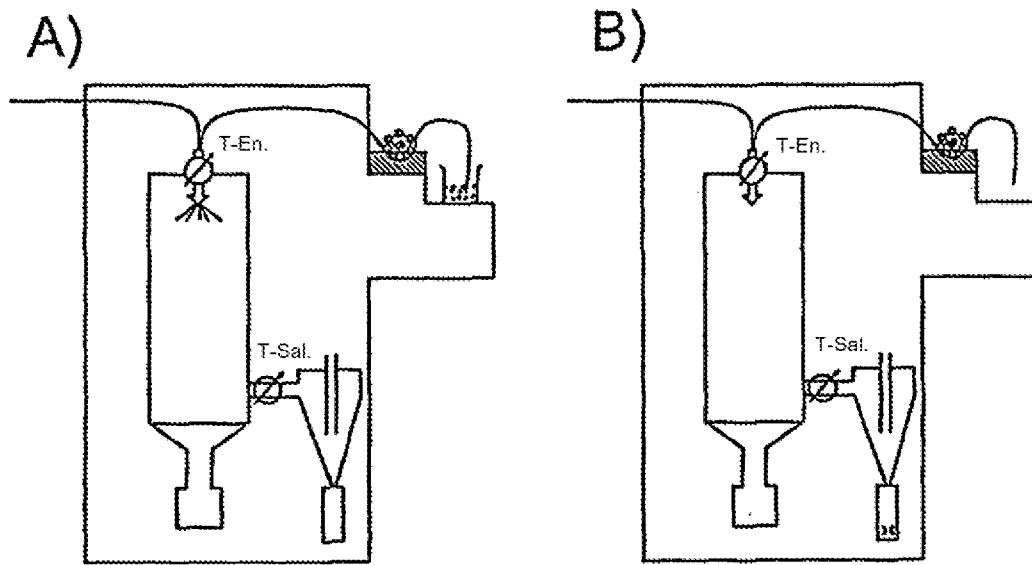


Fig. 11

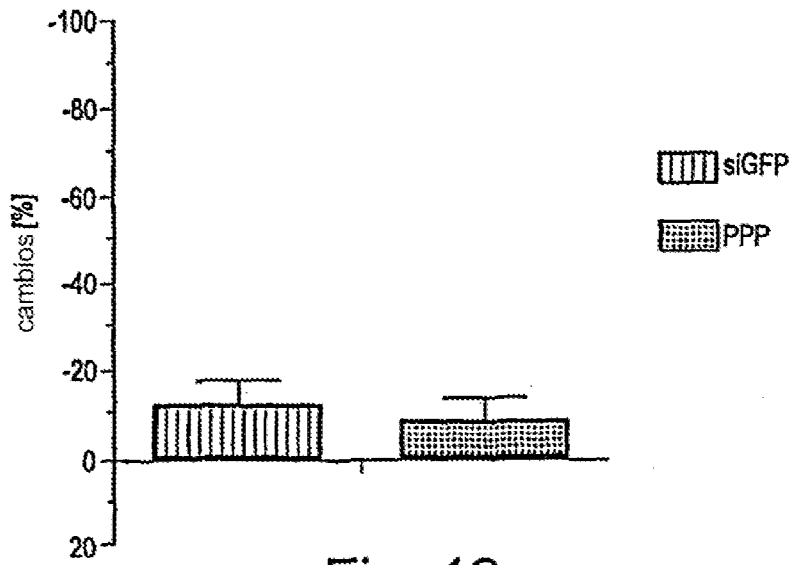


Fig. 12

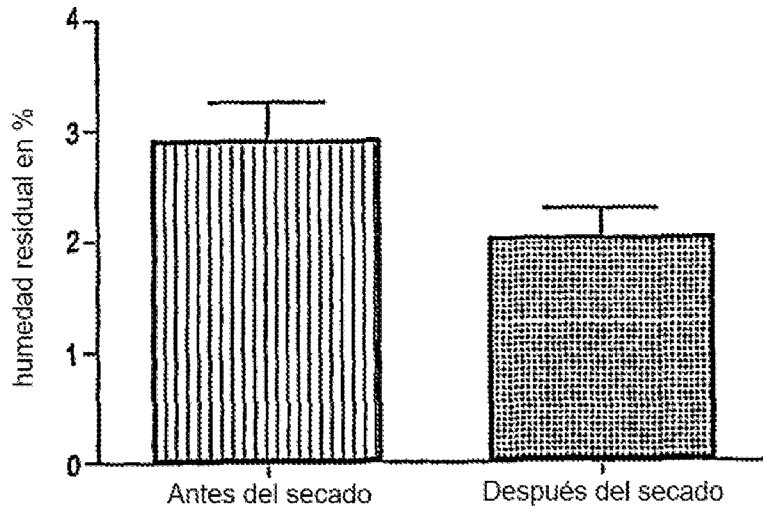


Fig. 13

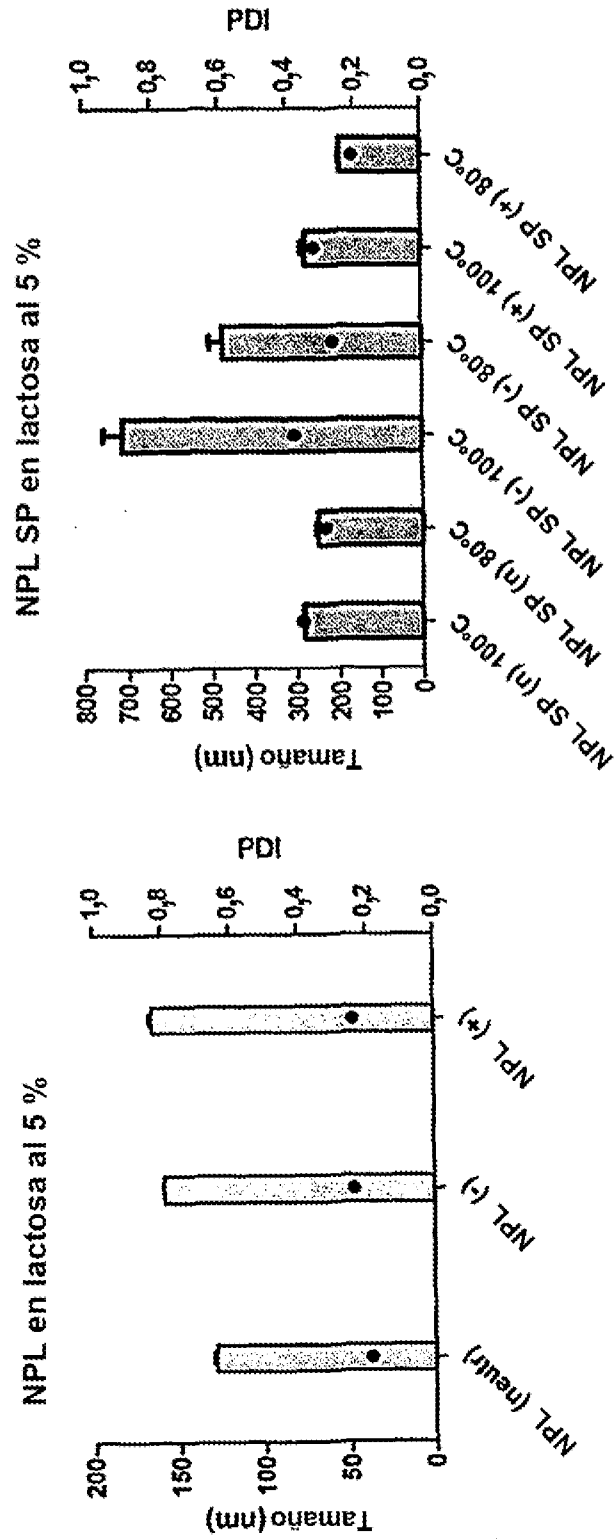


Figura 14

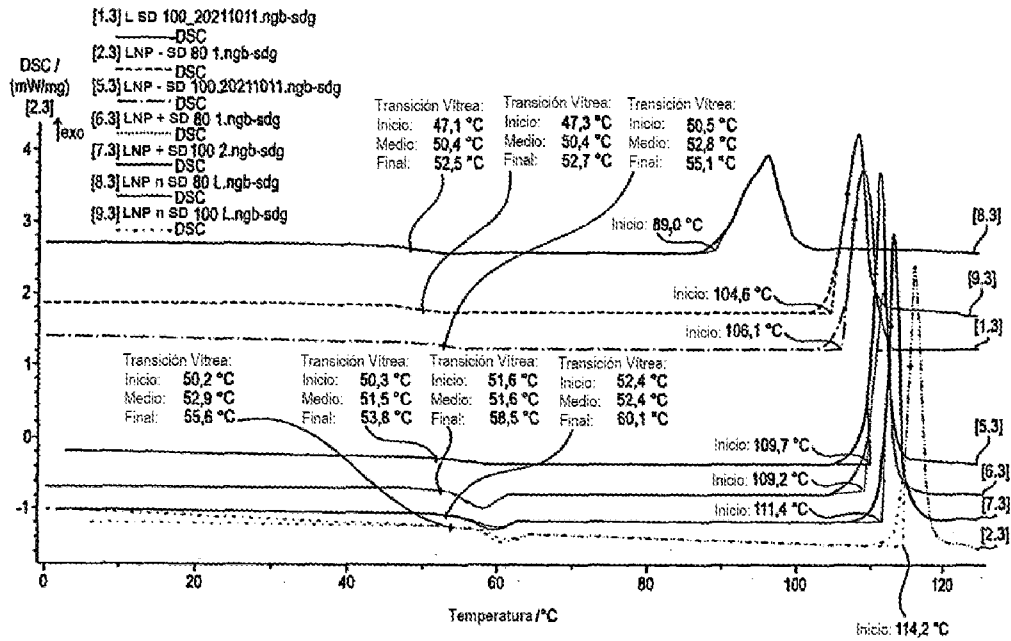


Fig. 15

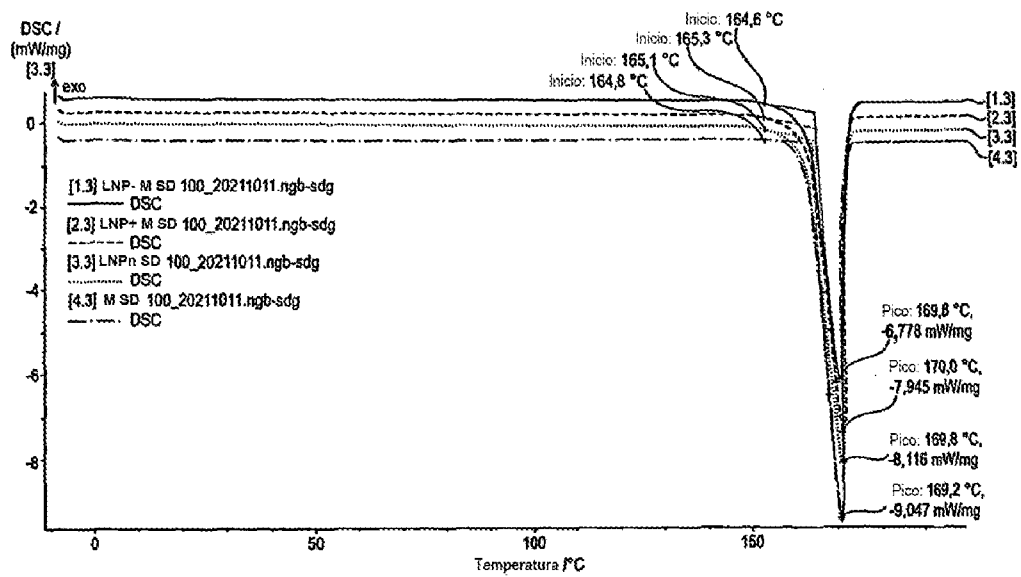


Fig. 16

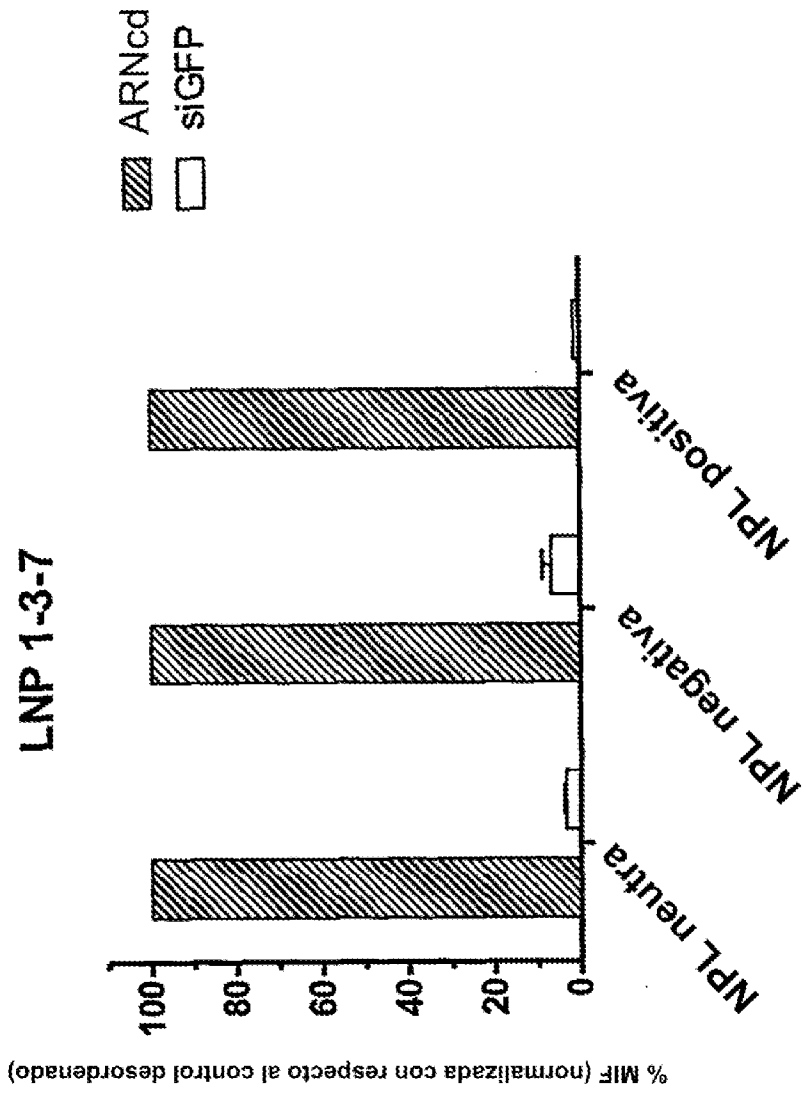


Figura 17

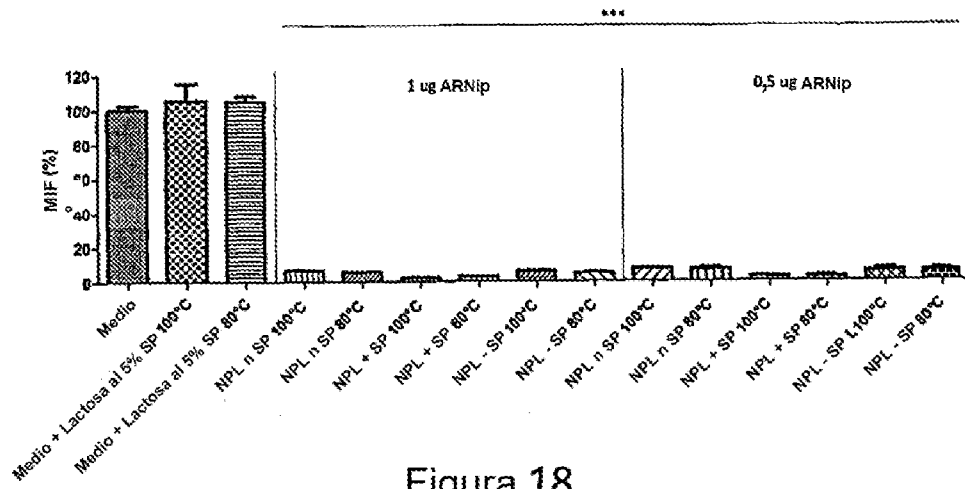


Figura 18

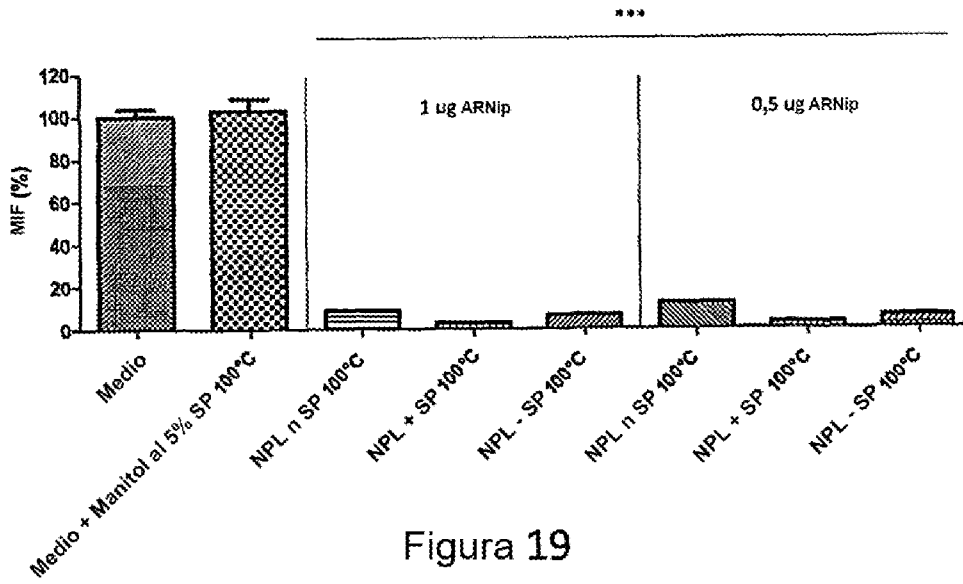


Figura 19