

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 960 939**

51 Int. Cl.:

A61K 47/10	(2007.01)
A61K 48/00	(2006.01)
A61K 9/51	(2006.01)
A61K 47/59	(2007.01)
A61K 47/69	(2007.01)
A61K 9/127	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.04.2019 PCT/EP2019/060646**

87 Fecha y número de publicación internacional: **31.10.2019 WO19207061**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.04.2019 E 19718760 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.07.2023 EP 3784285**

54 Título: **Agentes crioprotectores para formulaciones particuladas**

30 Prioridad:

25.04.2018 EP 18169325
14.08.2018 EP 18189010

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
07.03.2024

73 Titular/es:

ETHRIS GMBH (100.0%)
Semmelweisstrasse 3
82152 Planegg, DE

72 Inventor/es:

DOHMEN, CHRISTIAN y
BECK, PHILIPP

74 Agente/Representante:

GONZÁLEZ PECES, Gustavo Adolfo

ES 2 960 939 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

Agentes crioprotectores para formulaciones particuladas

5 La presente invención se refiere a composiciones para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad a ser administradas en o a través de las vías respiratorias, y que comprenden una formulación en partículas de un agente terapéuticamente activo que es un ácido nucleico, en particular una formulación que comprende nanopartículas o micropartículas y un aditivo crioprotector. Además, la invención proporciona un dispositivo que comprende tal composición para formar un aerosol o para su nebulización, y un aerosol obtenible a partir del dispositivo.

10 Las formulaciones de nanopartículas y micropartículas son conocidas por su capacidad para permitir que los agentes terapéuticamente activos entren en el cuerpo mediante la aplicación en el tracto respiratorio o a través de él. Sin embargo, muchos agentes activos formulados como nanopartículas o micropartículas adolecen de una estabilidad limitada a temperatura ambiente, e incluso en estado refrigerado (por ejemplo, a 2-8 °C). Una formulación congelada mejoraría significativamente la estabilidad a largo plazo y, por lo tanto, la aplicabilidad de agentes terapéuticamente activos formulados como nanopartículas o micropartículas. Sin embargo, la congelación en general conduce a procesos de agregación que están acompañados de una pérdida de función. Aunque la adición de aditivos crioprotectores convencionales previene la agregación de partículas durante la congelación (por ejemplo, W. Abdelwahed y otros, Adv. Drug Del. Rev.58 (2006), 1688-1713; JC Kasper y otros, J. Contr. Rei. 151 (2011), 246-255), persisten los problemas de que la formulación resultante no es funcional después de la aplicación pulmonar. Por lo tanto, la estabilización de nano o micropartículas durante la congelación mientras se mantiene su funcionalidad para la aplicación en el tracto respiratorio, o a través de él, no podría lograrse de manera confiable con crioprotectores estándar, tales como los azúcares.

25 En el contexto de la presente invención, se ha identificado una clase de aditivos que inesperadamente permiten la congelación de formulaciones de nano o micropartículas, mientras mantiene su funcionalidad durante la aplicación en el tracto respiratorio o a través de él. Las composiciones que combinan las formulaciones de partículas con tales aditivos crioprotectores permiten que las formulaciones se almacenen y/o transporten convenientemente en un estado sólido congelado, antes de su aplicación.

Por lo tanto, la presente invención proporciona, de acuerdo con un primer aspecto, un dispositivo para formar un aerosol a partir de una composición particulada suspendida en un líquido o para nebulizar dicha composición, cuyo dispositivo comprende una composición que comprende

- 30 (i) una formulación de nano o micropartículas de un agente terapéuticamente activo que está suspendida en una fase líquida, y
- (ii) al menos un aditivo crioprotector seleccionado de alcanos C3-C5 sustituidos por uno o dos grupos hidroxilo, en el que el agente terapéuticamente activo es un ácido nucleico.

35 Un aspecto adicional de la invención proporciona un aerosol que se puede obtener a partir del dispositivo de acuerdo con el primer aspecto de la invención de acuerdo con el primer aspecto de la invención. Un aspecto relacionado proporciona una composición como la comprendida por el dispositivo de acuerdo con el primer aspecto de la invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, en el que la composición ha de ser administrada en el tracto respiratorio o a través de este.

40 A continuación, se proporcionará una descripción detallada de la invención y de sus aspectos discutidos anteriormente. Se apreciará en este contexto que estos aspectos están estrechamente interrelacionados. Por lo tanto, se entenderá que la información detallada que se proporciona con respecto a las características de un aspecto se aplicará también a otros aspectos que se basan en esta característica, a menos que se indique de otra manera.

Agente terapéuticamente activo

Las composiciones para uso de acuerdo con la invención comprenden una formulación de nano o micropartículas de un agente terapéuticamente activo.

45 En este contexto, la referencia a una actividad terapéutica incluye agentes que se administran a un paciente para tratar una enfermedad o trastorno, así como agentes que se administran para evitar que una enfermedad o trastorno afecten a un paciente.

Un agente terapéuticamente activo para su uso en el contexto de la presente invención es un ácido nucleico.

50 Entre los ácidos nucleicos como agentes terapéuticamente activos comprendidos en las formulaciones de nano o micropartículas, se da preferentemente al ARN, con mayor preferencia al ARN monocatenario, y con la máxima preferencia al ARNm, incluido el ARNm modificado.

El término "ácido nucleico" abarca todas las formas de tipos de ácidos nucleicos de origen natural, así como ácidos nucleicos sintetizados química y/o enzimáticamente, y también abarca análogos de ácidos nucleicos y derivados de ácidos nucleicos tales como, por ejemplo, ácidos nucleicos bloqueados (LNA), ácidos nucleicos peptídicos (PNA),

oligonucleósidos tiofosfatos y fosfotriésteres, oligonucleótidos morfolinos, oligonucleótidos catiónicos (documentos US6017700 A, WO/2007/069092), ribo-oligonucleótidos sustituidos o fosforotioatos. Además, el término "ácido nucleico" también se refiere a cualquier molécula que comprende nucleótidos o análogos de nucleótidos. No existen limitaciones en cuanto a la secuencia o al tamaño de un ácido nucleico comprendido en la composición de la presente invención. El ácido nucleico se define predominantemente por el efecto biológico que debe lograr en la diana biológica a la que se suministra la composición de la presente invención. Por ejemplo, en el caso de una aplicación en terapia génica o de ácido nucleico, el ácido nucleico o la secuencia de ácido nucleico se puede definir por el gen o fragmento de gen a ser expresado, o por la sustitución o reparación prevista de un gen defectuoso o cualquier otra secuencia diana de un gen, o por la secuencia diana de un gen a ser inhibida, anulada o regulada por disminución.

El término "ácido nucleico" abarca oligonucleótidos o polinucleótidos, que incluyen ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN). En cuanto al ARN, en principio se puede emplear cualquier tipo de ARN en el contexto de la presente invención. En una realización preferente, el ARN es un ARN monocatenario. El término "ARN monocatenario" significa una única cadena consecutiva de ribonucleótidos en contraste con las moléculas de ARN, en las que dos o más cadenas separadas forman una molécula bicatenaria debido a la hibridación de las cadenas separadas. El término "ARN monocatenario" no excluye que la molécula monocatenaria forme en sí misma estructuras bicatenarias tales como bucles, estructuras secundarias o terciarias.

El término "ARN" cubre el ARN que codifica una secuencia de aminoácidos, así como el ARN que no codifica una secuencia de aminoácidos. Se ha sugerido que más del 80 % del genoma contiene elementos funcionales del ADN que no codifican proteínas. Estas secuencias no codificantes incluyen elementos de ADN reguladores (sitios de unión para factores de transcripción, reguladores y correguladores, etc.) y secuencias que codifican transcripciones que nunca se traducen en proteínas. Estas transcripciones, que están codificadas por el genoma y se transcriben en ARN pero no se traducen en proteínas, se denominan ARN no codificantes (ARNnc). Por lo tanto, en una realización, el ARN es un ARN no codificante. Preferentemente, el ARN no codificante es una molécula monocatenaria. Los estudios demuestran que los ARNnc son actores críticos en la regulación de los genes, el mantenimiento de la integridad genómica, la diferenciación celular y el desarrollo, y están mal regulados en diversas enfermedades humanas. Hay diferentes tipos de ARNnc: ARNnc cortos (20-50 nt), medianos (50-200 nt) y largos (>200 nt). El ARNnc corto incluye microARN (miARN), ARN de interferencia pequeño (ipARN), ARN que interactúa con piwi (piARN) y ARN iniciador de la transcripción (itARN). Los ejemplos de ARNnc medianos son los ARN nucleares pequeños (npARN), los ARN nucleolares pequeños (nupARN), los ARN de transferencia (tARN), los ARN asociados al sitio de inicio de la transcripción (TSSaARN), los ARN pequeños asociados al promotor (PASR) y las transcripciones del promotor corriente arriba (PROMPT). Los ARN no codificantes largos (nclARN) incluyen ARN no codificante intergénico largo (nclARN), nclARN antisentido, nclARN intrónico, ARN ultraconservados transcritos (T-UCR) y otros (Bhan A, Mandal SS, ChemMedChem. 26 de marzo de 2014. doi: 10.1002/cmdc.201300534). De los ARN no codificantes mencionados anteriormente, sólo el ipARN es bicatenario. Por lo tanto, dado que en una realización preferente el ARN no codificante es monocatenario, es preferente que el ARN no codificante no sea ipARN. En otra realización, el ARN es un ARN codificante, es decir, un ARN que codifica una secuencia de aminoácidos. Tales moléculas de ARN también se denominan ARNm (ARN mensajero) y son moléculas de ARN monocatenarias. Los ácidos nucleicos se pueden preparar mediante metodología de síntesis química y enzimática conocida por un experto en la técnica, o mediante el uso de tecnología recombinante, o se pueden aislar de fuentes naturales, o mediante una combinación de las mismas. Los oligo o polinucleótidos pueden comprender opcionalmente nucleótidos no naturales y pueden ser de mono, bi o triplecatenario. "Ácido nucleico" también se refiere a un oligo o polinucleótidos sentido y antisentido, es decir, una secuencia de nucleótidos que es complementaria a una secuencia de nucleótidos específica en un ADN y/o ARN.

Preferentemente, el término ácido nucleico en el contexto de la presente invención se refiere a ARN, con mayor preferencia a ARN monocatenario y con la máxima preferencia a ARNm. Se entenderá que, a menos que se indique de otra manera en un contexto específico, el término ARNm, como se usa en la presente memoria, abarca el ARNm modificado. En otras palabras, las nanopartículas o micropartículas usadas en el contexto de la presente invención comprenden preferentemente un ácido nucleico como agente terapéuticamente activo, y el ácido nucleico es preferentemente ARN, con mayor preferencia ARN monocatenario y con la máxima preferencia ARNm, cuyo ARNm puede ser ARNm modificado.

Los ARN mensajeros (ARNm) son copolímeros que están formados por bloques de construcción de fosfato de nucleósido principalmente con adenosina, citidina, uridina y guanosina como nucleósidos, que como portadores intermedios llevan la información genética del ADN en el núcleo de la célula al citoplasma, donde es traducido a proteínas. Por lo tanto, son adecuados como alternativas para la expresión génica.

En el contexto de la presente invención, debe entenderse que ARNm significa cualquier molécula de polirribonucleótido que, si entra en la célula, es adecuada para la expresión de una proteína o fragmento de la misma o es traducible a una proteína o fragmento de la misma. El término "proteína" aquí abarca cualquier tipo de secuencia de aminoácidos, es decir, cadenas de dos o más aminoácidos que están unidos cada uno mediante enlaces peptídicos, y también incluye péptidos y proteínas de fusión.

El ARNm contiene una secuencia de ribonucleótidos que codifica una proteína o un fragmento de la misma cuya función en la célula, o en los alrededores de la célula, es necesaria o beneficiosa, por ejemplo, una proteína cuya falta o forma defectuosa es un desencadenante de una enfermedad o dolencia, cuya provisión puede moderar o prevenir

una enfermedad o una dolencia, o una proteína que puede promover un proceso que es beneficioso para el cuerpo, en una célula o sus alrededores. El ARNm puede contener la secuencia de la proteína completa o una variante funcional de la misma. Además, la secuencia de ribonucleótidos puede codificar una proteína que actúa como factor, inductor, regulador, estimulador o enzima, o un fragmento funcional de la misma, donde esta proteína es una cuya función es necesaria para remediar un trastorno, en particular un trastorno metabólico, o para iniciar procesos in vivo, tales como la formación de nuevos vasos sanguíneos, tejidos, etc. Aquí, se entiende que variante funcional significa un fragmento que en la célula puede asumir la función de la proteína cuya función en la célula es necesaria, o cuya falta o forma defectuosa es patogénica. Además, el ARNm también puede tener otras regiones funcionales y/o regiones no codificantes 3' o 5'. Las regiones no codificantes 3' y/o 5' pueden ser las regiones que flanquean naturalmente la secuencia que codifica la proteína o secuencias artificiales que contribuyen a la estabilización del ARN. Los expertos en la técnica pueden determinar las secuencias adecuadas para esto en cada caso mediante experimentos de rutina.

En una realización preferente, el ARNm contiene un capuchón de m7GpppG, un sitio interno de entrada ribosoma (IRES) y/o una cola de poliA en el extremo 3', en particular para mejorar la traducción. El ARNm puede tener más regiones que promuevan la traducción.

En una realización preferente, el ARNm es un ARNm que contiene una combinación de nucleótidos modificados y no modificados. Preferentemente, es un ARNm que contiene una combinación de nucleótidos modificados y no modificados como se describe en el documento WO2011/012316. Se informa que el ARNm descrito en el mismo muestra una estabilidad aumentada y una inmunogenicidad disminuida. En una realización preferente, tal que en un ARNm modificado se modifica del 5 al 50 % de los nucleótidos de citidina y del 5 al 50 % de los nucleótidos de uridina. Los nucleótidos que contienen adenosina y guanosa pueden ser no modificados. Los nucleótidos de adenosina y guanosa pueden ser no modificados o ser parcialmente modificados, y preferentemente están presentes en forma no modificada. Preferentemente del 10 al 35 % de los nucleótidos de citidina y uridina están modificados, y de manera particularmente preferente el contenido de los nucleótidos de citidina modificados se encuentra en un intervalo de 7,5 a 25 %, y el contenido de nucleótidos de uridina modificados en un intervalo de 7,5 a 25 %. Se ha encontrado que, de hecho, un contenido relativamente bajo, por ejemplo solo el 10% de los nucleótidos de citidina y uridina modificados puede lograr las propiedades deseadas. Es particularmente preferente que los nucleótidos de citidina modificados sean los residuos de 5-metilcitidina, y los nucleótidos de uridina modificados sean residuos de 2-tiouridina. Con la máxima preferencia, el contenido de nucleótidos de citidina modificados y el contenido de nucleótidos de uridina modificados es 25 %, respectivamente.

En otra realización preferente, el ARNm puede combinarse con sitios de unión a diana, secuencias de diana y/o con sitios de unión a microARN, para permitir la actividad del ARNm deseado solo en las células relevantes. En una realización preferente adicional, el ARN puede combinarse con microARN o shARN aguas abajo de la cola 3' poliA.

Además, el término "ácido(s) nucleico(s)" puede referirse a ADN o ARN o a sus híbridos o a cualquiera de sus modificaciones conocidos en el estado de la técnica (véanse, por ejemplo, los documentos US 8278036, WO 2013/052523, WO 2011/012316, US 5525711, US 4711955, US 5792608 o EP 302175, (Lorenz et al. 2004, *Bioorg Med Chem Lett*, 14, 4975-4977; Soutschek et al. 2004, *Nature*, 432, 173-178) para ejemplos de modificaciones). Tal(es) molécula(s) de ácido nucleico son mono o bicatenarias, lineales o circulares, naturales o sintéticas y sin limitación de tamaño. Por ejemplo, la(s) molécula(s) de ácido nucleico pueden ser ADN genómico, ADNc, ARNm, ARN antisentido, ribozima o ARN de interferencia pequeños (ipARN), micro ARN, antagomirs o ARN de horquilla corta (hcARN), tARN o ARN largo bicatenario o un constructo de ADN que codifica tal ARN o quimeroplastos (Colestraus et al. 1996, *Science*, 273, 1386-1389), o aptámeros, repeticiones palindrómicas cortas agrupadas y regularmente interespaciadas ("CRISPR" por RNA-guided sitespecific DNA cleavage) (Cong et al. 2013, *Science*, 339, 819-823), o ARN y ADN. Tal(es) molécula(s) de ácido nucleico puede estar en forma de plásmidos, cósmidos, cromosomas artificiales, ADN o ARN viral, ADN de bacteriófago, ARNm monocatenario o bicatenario, codificante y no codificante, y oligonucleótido (s), en los que se incluye cualquiera de las modificaciones del estado de la técnica en el esqueleto del azúcar y/o en las bases, como se describe anteriormente, y modificaciones 3' o 5'. En una realización particularmente preferente, el ácido nucleico es ARN, con mayor preferencia ARNm o ipARN, y con la máxima preferencia ARNm.

El(Los) ácido(s) nucleico(s) pueden contener una secuencia de nucleótidos que codifica un polipéptido que se va a expresar en una célula diana. Se pueden usar procedimientos que son bien conocidos por los expertos en la técnica para construir moléculas de ácido nucleico recombinantes; véanse, por ejemplo, las técnicas descritas en Sambrook et al., *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (2001) N.Y. y Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1989).

Como se señaló anteriormente, el ácido nucleico estaría comprendido como un agente terapéuticamente activo preferente en la formulación de nano o micropartículas. En general, los efectos terapéuticos se pueden lograr mediante la interacción del ácido nucleico con moléculas y organelos celulares. Tal interacción sola puede, por ejemplo, activar el sistema inmune innato, como es el caso de ciertos oligonucleótidos CpG y secuencias diseñadas para interactuar específicamente con receptores de tipo toll, y otros receptores extra o intracelulares. Además, la captación o introducción de ácidos nucleicos en las células puede estar destinada a la expresión de secuencias de nucleótidos tales como genes comprendidos en el ácido nucleico, puede estar destinada a la regulación negativa, a silenciar o

anular la expresión génica endógena como consecuencia de la presencia intracelular de un ácido nucleico exógeno introducido, o puede estar destinado a la modificación de secuencias de ácido nucleico endógeno tales como reparación, escisión, inserción o intercambio de bases seleccionadas o de tramos completos de secuencias de ácido nucleico endógeno, o puede estar destinado a la interferencia con prácticamente cualquier proceso celular como consecuencia de la presencia e interacción intracelular de un ácido nucleico exógeno introducido. La sobreexpresión de ácidos nucleicos exógenos introducidos puede estar destinada a compensar o complementar la expresión génica endógena, en particular en los casos en los que un gen endógeno es defectuoso o silencioso, lo que conduce a un producto de la expresión génica nula, insuficiente o defectuosa o disfuncional, tal como es el caso con muchas enfermedades metabólicas y hereditarias como fibrosis quística, hemofilia o distrofia muscular, por nombrar algunas.

La sobreexpresión de ácidos nucleicos exógenos introducidos también puede pretender que el producto de la expresión interactúe o interfiera con cualquier proceso celular endógeno, tal como la regulación de la expresión génica, la transducción de señales y otros procesos celulares. La sobreexpresión de ácidos nucleicos exógenos introducidos también puede estar destinada a dar lugar a una respuesta inmune en el contexto del organismo en el que reside o se hace residir a una célula transfectada o transducida. Son ejemplos, la modificación genética de células presentadoras de antígenos, como las células dendríticas, para que presenten un antígeno con fines de vacunación. Otros ejemplos son, la sobreexpresión de citocinas en tumores para provocar una respuesta inmune específica al tumor. Además, la sobreexpresión de ácidos nucleicos exógenos introducidos también puede estar destinada a generar células modificadas genéticamente de forma transitoria, in vivo o ex vivo, para terapias celulares, tales como células T modificadas o precursoras, o células madre u otras células para medicina regenerativa.

La regulación negativa, el silenciamiento o la desactivación de la expresión génica endógena con fines terapéuticos se puede lograr, por ejemplo, mediante la interferencia de ARN (iARN), con ribozimas, oligonucleótidos antisentido, tARN, ARN bicatenario largo donde dicha regulación negativa puede ser específica de secuencia o inespecífica, y también puede conducir a la muerte celular, como es el caso cuando se introducen en las células ARN de doble cadena largos. La regulación negativa, el silenciamiento o la eliminación de la expresión génica endógena o preexistente puede ser útil en el tratamiento de enfermedades adquiridas, hereditarias o que se contraen espontáneamente, incluidas infecciones virales y cáncer. También puede verse que la introducción de ácidos nucleicos en las células se pueda practicar como medida preventiva para prevenir, por ejemplo, infecciones virales o neoplasias. La regulación negativa, el silenciamiento o la eliminación de la expresión génica endógena se puede ejercer a nivel transcripcional y nivel traduccional. Los expertos en la técnica conocen múltiples mecanismos e incluyen, por ejemplo, modificaciones epigenéticas, cambios en la estructura de la cromatina, unión selectiva de factores de transcripción por el ácido nucleico introducido, hibridación del ácido nucleico introducido con secuencias complementarias en ADN genómico, ARNm u otras especies de ARN por apareamiento de bases, incluidos mecanismos de apareamiento de bases no convencionales, tal como la formación de triple hélice. De manera similar, la reparación de genes, los cambios de base o de secuencia se pueden lograr a nivel genómico y a nivel de ARNm, incluida la omisión de exón. Los cambios de base o de secuencia se pueden lograr, por ejemplo, mediante la escisión del ADN de un sitio específico guiada por ARN, mediante mecanismos de corte y pegado que aprovechan el trans-empalme, el trans-empalme en ribozimas, los quimeraplastos, el trans-empalme de ARN mediado por esplisomas o al aprovechar el grupo II o los intrones reorientados, o al aprovechar la mutagénesis de inserción mediada por virus, o al aprovechar la inserción genómica dirigida mediante el uso de sistemas de integrasa procarionta, eucariota o viral. Como los ácidos nucleicos son los portadores de los planes de construcción de los sistemas vivos y participan en muchos procesos celulares de manera directa e indirecta, en teoría cualquier proceso celular puede verse influido por la introducción de ácidos nucleicos en las células desde el exterior. En particular, esta introducción se puede llevar a cabo directamente in vivo y ex vivo en cultivo de células u órganos, seguido del trasplante de tales órganos o células modificados a un receptor. Las formulaciones de nano o micropartículas para su uso en el contexto de la presente invención, con ácidos nucleicos como agente terapéuticamente activo, pueden ser útiles para todos los propósitos descritos anteriormente.

Se entenderá que las formulaciones de nano o micropartículas para su uso en el contexto de la presente invención pueden comprender un único agente terapéuticamente activo, pero alternativamente pueden comprender una combinación de dos o más agentes terapéuticamente activos, por ejemplo, en forma de partículas que comprenden dos o más tipos de agentes terapéuticamente activos combinados en partículas individuales, o en forma de una mezcla de partículas que difieren en el tipo de agente terapéuticamente activo contenido en el mismo.

La formulación de partículas

Las composiciones de acuerdo con la invención (es decir, la composición en suspensión y la composición sólida) comprenden una formulación de nano o micropartículas del agente terapéuticamente activo. Como entenderá el lector experto, "o" se usa en este contexto de una manera no exclusiva, a menos que se indique específicamente lo contrario.

Por lo tanto, la referencia a formulaciones de nano o micropartículas incluye formulaciones que contienen nanopartículas que comprenden el agente terapéuticamente activo, formulaciones que contienen micropartículas que comprenden el agente terapéuticamente activo, y formulaciones que contienen tanto nanopartículas como micropartículas que comprenden el agente terapéuticamente activo. Por motivos de conveniencia, la "formulación de nano o micropartículas" puede abreviarse en la discusión de la invención en la presente memoria como "formulación de partículas" o "formulación particulada". De manera similar, las nanopartículas o micropartículas pueden denominarse "las partículas".

Las partículas de la formulación de nano o micropartículas pueden contener el agente terapéuticamente activo como

único componente. Sin embargo, es preferente que las partículas contengan el agente terapéuticamente activo en combinación con uno o más componentes adicionales. Estos componentes adicionales son típicamente componentes farmacéuticamente aceptables, por ejemplo, excipientes o aditivos que son farmacéuticamente aceptables.

5 La formulación de nano o micropartículas en la composición de acuerdo con la invención comprende nanopartículas o micropartículas que contienen el agente terapéuticamente activo. La formulación de partículas puede consistir en tales nanopartículas o micropartículas. Como se usa en la presente memoria, el término nanopartículas se refiere generalmente a partículas con un diámetro en el intervalo de tamaño nanométrico, es decir, un diámetro de 1 nm o más, e inferior a 1.000 nm. El término micropartículas se refiere generalmente a partículas con un diámetro en el intervalo de tamaño micrométrico, es decir, un diámetro de 1.000 nm o más, y 100 μm o menos.

10 La formulación de nano o micropartículas muestra típicamente un diámetro promedio de partículas en el intervalo de 1 a 4.000 nm, con mayor preferencia de 2 a 2.500 nm y con la máxima preferencia de 5 a 1.000 nm.

15 El límite superior para el diámetro de las partículas individuales en la formulación de nanopartículas o micropartículas es preferentemente de 20 μm , con mayor preferencia de 10 μm y con la máxima preferencia de 5 μm . Por lo tanto, como se entenderá por lo anterior, una formulación de partículas muy preferente sería una con un diámetro promedio de partículas en el intervalo de 5 a 1.000 nm, y partículas con un diámetro máximo de partícula de 5 μm .

20 Los diámetros de partícula y el diámetro promedio de partículas de la formulación de nano o micropartículas como se menciona en la presente memoria se pueden determinar convenientemente mediante la dispersión dinámica de la luz (DLS). Generalmente, los diámetros y el diámetro medio a los que se hace referencia en la presente memoria se indican como diámetros hidrodinámicos de las partículas en estado suspendido, determinados mediante la dispersión dinámica de la luz. Dado que el equipo de medición (por ejemplo, Malvern ZetaSizer) tiene en cuenta el efecto de la temperatura al informar los resultados, los diámetros medidos generalmente no dependen de la temperatura. Sin embargo, la medición se realiza normalmente a temperatura ambiente (25 °C). Como medio de suspensión para las mediciones de DLS, se puede usar, por ejemplo, agua, o agua que contenga el aditivo crioprotector, según sea apropiado. En el caso de una composición sólida congelada, los diámetros de las partículas se determinan típicamente después de descongelar la composición. En los casos donde se indica un tamaño promedio de partículas o un diámetro promedio de partículas, el promedio es típicamente el promedio z, a menos que se indique de otra manera.

Preferentemente, la formulación de nanopartículas o micropartículas tiene una carga activa, expresada como el peso del agente terapéuticamente activo al peso total de las partículas en la formulación de partículas, en el intervalo de 0,1 a 95 % (p/p), con mayor preferencia de 0,5 a 90 % (p/p), con la máxima preferencia de 1 a 80 % (p/p).

30 Además del agente terapéuticamente activo, las partículas de la formulación de nano o micropartículas para su uso en el contexto de la presente invención pueden comprender uno o más componentes adicionales, por ejemplo, excipientes o aditivos que son típicamente componentes farmacéuticamente aceptables. Por ejemplo, dichos componentes adicionales pueden facilitar el transporte a sitios específicos o promover la absorción adicional de las partículas en sitios específicos, después de que se hayan administrado a un paciente, o pueden ayudar a estabilizar las partículas o el agente terapéuticamente activo contenido en el mismo.

Un componente útil para las partículas que comprenden el ácido nucleico es un vector viral. Tales vectores virales son conocidos en la técnica, como se discute, por ejemplo, en el artículo de revisión de A.C. Silva et al., *Current Drug Metabolism*, 16, 2015, 3-16, y en la bibliografía allí comentada.

40 Además, se establecen diversos polímeros como excipientes para la formulación de agentes terapéuticamente activos en formulaciones de partículas que comprenden nanopartículas o micropartículas.

45 Tales polímeros también pueden proporcionar un componente adicional para las formulaciones particuladas, como se usan en el contexto de la presente invención. Por ejemplo, los excipientes poliméricos adecuados incluyen polímeros que se pueden reabsorber en el cuerpo después de la administración de las partículas a un paciente, tales como polímeros, incluidos polímeros naturales, formados a partir de aminoácidos, carbohidratos o de ácido láctico y/o glicólico.

50 Para la formulación de partículas que comprende un ácido nucleico, preferentemente ARN, con mayor preferencia ARN monocatenario y con la máxima preferencia ARNm, como agente terapéuticamente activo, un componente adicional preferente es un excipiente catiónico. Tal excipiente catiónico y un ácido nucleico, que proporciona cargas negativas, pueden formar un complejo juntos. Se entenderá que la referencia a un excipiente catiónico no excluye la presencia de grupos aniónicos o de regiones neutras en el excipiente respectivo, siempre que los grupos catiónicos estén presentes en un número suficientemente alto para proporcionar una carga catiónica global del excipiente.

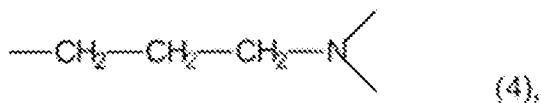
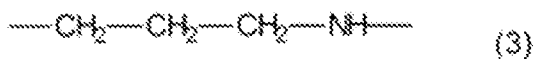
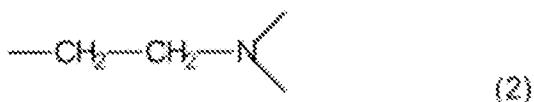
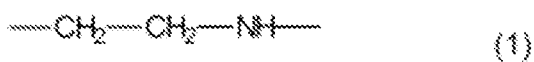
55 Por lo tanto, de acuerdo con una realización preferente, las formulaciones de nano o micropartículas mencionadas en el contexto de la presente invención son formulaciones de partículas que comprenden un ácido nucleico, preferentemente ARN, con mayor preferencia ARN monocatenario, y con la máxima preferencia ARNm, como el agente terapéuticamente activo en forma de un complejo formado por el ácido nucleico y un oligómero o polímero catiónico, preferentemente un polímero, como excipiente catiónico. En la técnica, un complejo tal como este se denomina poliplex.

5 Tales poliplexos, y oligómeros o polímeros adecuados que pueden formarlos, son conocidos en la técnica. Los ejemplos de oligómeros o polímeros catiónicos adecuados para la formación de poliplexos, que también se pueden usar en las formulaciones de partículas mencionadas en el contexto de la presente invención, se discuten en A.C. Silva et al., *Current Drug Metabolism*, 16, 2015, 3-16, y en la bibliografía allí citada, en J.C. Kasper et al., *J. Contr. Rei.* 151 (2011), 246-255, en el documento WO 2014/207231 y en la literatura mencionada en el mismo, y en el documento WO 2016/097377 y en la literatura mencionada en el mismo.

Los oligómeros o polímeros catiónicos adecuados incluyen en particular oligómeros o polímeros catiónicos que comprenden una pluralidad de unidades en las que está contenido un grupo amino. Los grupos amino pueden protonarse para proporcionar la carga catiónica del polímero.

10 En un poliplex formado a partir de un ácido nucleico y un oligómero o polímero catiónico que comprende una pluralidad de unidades en las que está contenido un grupo amino, la relación N/P del número de átomos de nitrógeno de amina en el oligómero o polímero catiónico al número de grupos fosfato en el ácido nucleico está preferentemente en el intervalo de 1 a 100, con mayor preferencia de 2 a 80, y con la máxima preferencia de 3 a 60.

15 Entre los oligómeros o polímeros catiónicos que comprenden una pluralidad de grupos amino, son preferentes los oligómeros o polímeros que comprenden una pluralidad de unidades seleccionadas independientemente de los siguientes (1), (2), (3) y (4):

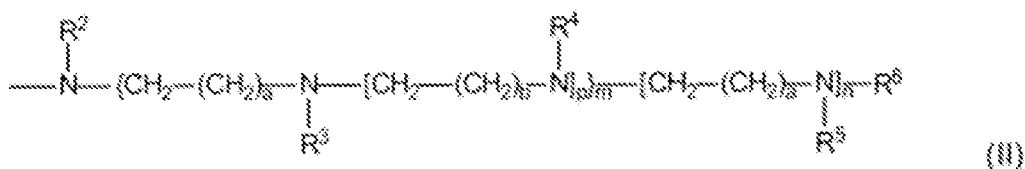


en el que uno o más de los átomos de nitrógeno de las unidades repetidas (1), (2), (3) y/o (4) pueden protonarse para proporcionar la carga catiónica del polímero.

20 Particularmente preferentes como oligómeros o polímeros catiónicos para la provisión de una formulación de partículas son las siguientes cuatro clases de oligómeros o polímeros que comprenden una pluralidad de unidades en las que está contenido un grupo amino.

Como primera clase preferente, se menciona la poli(etilenimina) ("PEI"), que incluye la poli (etilenimina) ramificada ("brPEI").

25 La segunda clase preferente de oligómeros o polímeros catiónicos son oligómeros o polímeros que comprenden una pluralidad de grupos de la siguiente fórmula (II) como cadena lateral y/o como grupo terminal, como se divulgan en el documento WO 2014/207231 (solicitante ethris GmbH):



30 en el que las variables a, b, p, m, n y R² a R⁶ se definen como sigue, independientemente para cada grupo de fórmula (II) en una pluralidad de tales grupos:

a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,

p es 1 o 2,

m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m+n es ≥ 2; y

R² a R⁵ se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH₂-CH(OH)-R⁷,

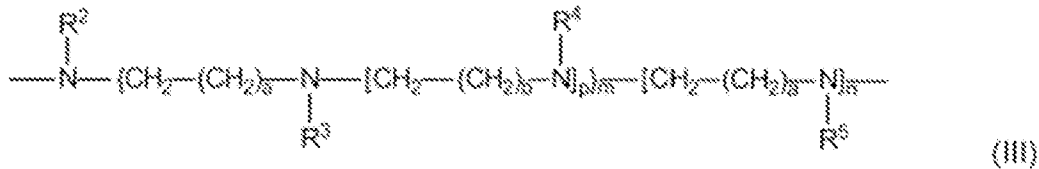
-CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ o -CH₂-R⁷ en el que R⁷ se selecciona de alquilo C3-C18 o alquenilo C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; y una cadena de poli(etilen glicol);

- 5 R⁶ se selecciona de hidrógeno; un grupo -CH₂-CH(OH)-R⁷, -CH(R⁷)-CH-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷, -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ o -CH₂-R⁷ en el que R⁷ se selecciona de alquilo C3-C18 o alquenilo C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH₂; una cadena de poli(etilen glicol); y un ligando receptor,

y en el que uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (II) pueden protonarse para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (II).

- 10 Con respecto a las definiciones preferentes adicionales de estos oligómeros o polímeros, y de las variables contenidas en la fórmula (II) anterior, la divulgación respectiva en el documento WO 2014/207231 también se aplica a la invención descrita en la presente memoria, a menos que se indique específicamente de otra manera. También, en términos de las composiciones que contienen ácidos nucleicos y estos oligómeros y polímeros en forma de poliplexos, la información proporcionada en el documento WO 2014/207231 es aplicable para las formulaciones de partículas mencionadas en la presente memoria.
- 15

La tercera clase preferente de oligómeros o polímeros catiónicos son oligómeros o polímeros que comprenden una pluralidad de grupos de la siguiente fórmula (III) como unidades repetidas, como se divulgan en el documento WO 2014/207231 (solicitante ethris GmbH):



- 20 en el que las variables a, b, p, m, n y R² a R⁵ se definen como sigue, independientemente para cada grupo de fórmula (III) en una pluralidad de tales grupos:

a es 1 y b es un número entero de 2 a 4; o a es un número entero de 2 a 4 y b es 1,

p es 1 o 2,

m es 1 o 2; n es 0 o 1 y m+n es ≥ 2; y

- 25 R² a R⁵ se seleccionan, independientemente entre sí, de hidrógeno; un grupo -CH₂-CH(OH)-R⁷,

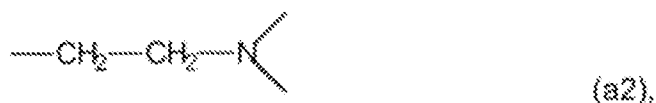
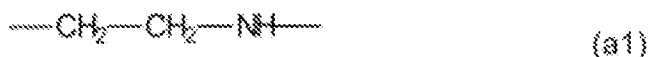
-CH(R⁷)-CH₂-OH, -CH₂-CH₂-(C=O)-O-R⁷ o -CH₂-CH₂-(C=O)-NH-R⁷ o -CH₂-R⁷ en el que R⁷ se selecciona de alquilo C3-C18 o alquenilo C3-C18 que tiene un doble enlace C-C; un grupo protector para un grupo amino; -C(NH)-NH₂; y una cadena de poli(etilen glicol);

- 30 y en el que uno o más de los átomos de nitrógeno indicados en la fórmula (III) pueden estar protonados para proporcionar un grupo catiónico de fórmula (III).

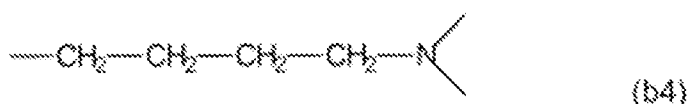
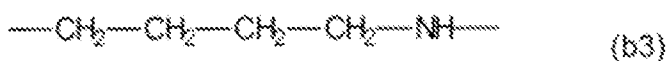
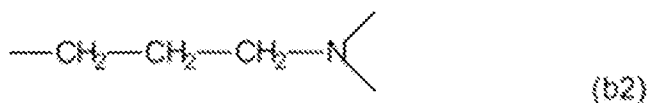
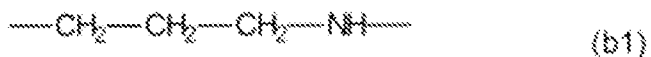
Con respecto a las definiciones preferentes adicionales de estos oligómeros o polímeros, y de las variables contenidas en la fórmula (III) anterior, la divulgación respectiva en el documento WO 2014/207231 también se aplica a la invención descrita en la presente memoria, a menos que se indique específicamente lo contrario. También, en términos de las composiciones que contienen ácidos nucleicos y estos oligómeros y polímeros en forma de poliplexos, la información proporcionada en el documento WO 2014/207231 es aplicable para las formulaciones de partículas mencionadas en la presente memoria.

35

La cuarta clase preferente de oligómeros o polímeros catiónicos es proporcionada por un copolímero estadístico como se divulga en el documento WO 2016/097377 (solicitante ethris GmbH). Comprende una pluralidad de unidades repetidas (a) seleccionadas independientemente de unidades repetidas de las siguientes fórmulas (a1) y (a2):



y una pluralidad de unidades repetidas (b) seleccionadas independientemente de unidades repetidas de las siguientes fórmulas (b1) a (b4):



- 5 y la relación molar de la suma de las unidades repetidas (a) a la suma de las unidades repetidas (b) se encuentra dentro del intervalo de 0,7/1,0 a 1,0/0,7, y uno o más de los átomos de nitrógeno de las unidades repetidas (a) y/o (b) contenidos en el copolímero pueden protonarse para proporcionar un copolímero catiónico.

Con respecto a las definiciones preferentes adicionales de este copolímero, la divulgación respectiva en el documento WO 2016/097377 también se aplica a la invención descrita en la presente memoria, a menos que se indique específicamente lo contrario. Como se indica en el mismo, un copolímero particularmente preferente es un copolímero lineal que comprende unidades repetidas (a1) y (b1), o que consta de unidades repetidas (a1) y (b1). También, en términos de las composiciones que contienen ácidos nucleicos y estos oligómeros y polímeros en forma de poliplexos, la información proporcionada en el documento WO 2016/097377 es aplicable para las formulaciones de partículas mencionadas en la presente memoria.

15 De acuerdo con otra realización preferente, las formulaciones de nano o micropartículas mencionadas en el contexto de la presente invención son formulaciones de partículas que comprenden un ácido nucleico, preferentemente ARN, con mayor preferencia ARN monocatenario, y con la máxima preferencia ARNm, como agente terapéuticamente activo en la forma de un complejo formado por el ácido nucleico y un lípido catiónico o un lipidoide catiónico como un excipiente catiónico. A menos que se defina de otra manera, tales complejos comprenden en particular lipoplejos, liposomas y nanopartículas lipídicas ("LNP") que comprenden un complejo del ácido nucleico y un lípido catiónico o un lipidoide catiónico.

Los lípidos catiónicos o lípidos catiónicos y lipidoide adecuados, que también pueden utilizarse para la formación de un complejo con ácido nucleico en el contexto de la presente invención, son conocidos en la técnica y se discuten, por ejemplo, en A.C. Silva et al., Current Drug Metabolism, 16, 2015, 3-16, y en la bibliografía mencionada en la misma, en los documentos US 2017/0267631, WO 2016/081029, WO 2011/071860, WO 2016/118697, US 8450298 B2, WO 2014/207231 y en E.R. Lee et al., Human Gene Therapy 7:1701-1717, September 10, 1996. El término "lipidoide" se establece para sustancias que no tienen la estructura de un lípido, pero muestran las características de un lípido.

Una clase preferente de lipidoide para su uso en las formulaciones de partículas que contienen un ácido nucleico, preferentemente ARN, con mayor preferencia ARN monocatenario, con la máxima preferencia ARNm, como agente terapéuticamente activo en forma de complejo con el lipidoide catiónico, por ejemplo, como lipoplex, liposoma o LNP, son lipidoide que tienen la estructura de la siguiente fórmula (IV), como se divulga en el documento WO 2014/207231 (solicitante: ethris GmbH):

diámetro promedio de partículas en el intervalo de 1 a 4.000 nm, con mayor preferencia de 2 a 2.500 nm, y con la máxima preferencia de 5 a 1.000 nm. El límite superior para el diámetro de las partículas en la formulación de nano o micropartículas es preferentemente de 20 µm, con más preferencia de 10 µm y con la máxima preferencia de 5 µm.

Además del agente terapéuticamente activo, la formulación de partículas puede comprender, como aditivo opcional o como aditivos opcionales, uno o más componentes que ejercen una función efectora durante el suministro del agente terapéutico, y preferentemente durante el suministro de un ácido nucleico como agente terapéutico hacia y dentro de la célula. Tales componentes pueden ser, pero sin limitación, polianiones, lípidos como se describieron anteriormente, policationes adicionales distintos de los discutidos anteriormente para la formación de poliplexos, tal como péptidos catiónicos, oligómeros o polímeros protectores, poloxámeros (también conocidos como plurónicos), poloxaminas, ligandos dirigidos, agentes endosomolíticos, péptidos de señal y penetrantes de células, nanopartículas magnéticas y no magnéticas, inhibidores de ARNasa, colorantes fluorescentes, radioisótopos o agentes de contraste para obtención de imágenes médicas. El término "función efectora" abarca cualquier función que apoye la consecución de un efecto biológico pretendido del agente terapéuticamente activo de la composición en o dentro de una diana biológica, o en los alrededores de una diana biológica. Por ejemplo, se han formulado composiciones para la administración de ácidos nucleicos para comprender ácidos nucleicos no codificantes o polianiones de ácidos no nucleicos como materiales de relleno (Kichler et al. 2005, *J Gene Med*, 7, 1459-1467). Tales materiales de relleno son adecuados para reducir la dosis de un ácido nucleico que tiene un efecto biológico pretendido, mientras se mantiene la extensión o grado de ese efecto obtenido a una dosis de ácido nucleico más alta, en ausencia de dicho material de relleno. También se han usado polianiones de ácido no nucleico para obtener una expresión génica in vivo prolongada con una toxicidad reducida (Uchida et al. 2011, *J Control Release*, 155, 296-302). Las formulaciones de partículas de la presente invención que comprenden un complejo de un ácido nucleico con un polímero u oligómero catiónico también pueden comprender lípidos catiónicos, aniónicos o neutros como es el caso de los lipopoliplexos (Li y Huang en "Nonviral vectors for Gene Therapy", Academic Press 1999, Capítulo 13, 295-303). Los lipopoliplexos se pueden preparar ventajosamente a partir de polímeros correspondientes a las fórmulas (II), o (III) como se muestra anteriormente con los lípidos correspondientes a la fórmula (IV), como se muestra anteriormente. Además, la formulación de partículas usadas en la presente invención puede comprender oligocationes o policationes distintos de los discutidos anteriormente para la formación de poliplexos. Tales policationes adicionales pueden ser útiles para lograr un grado deseado de compactación de un ácido nucleico o, en el caso de péptidos policationes, pueden tener una función de señal de localización nuclear como la descrita anteriormente (Ritter et al. 2003, *J Mol Med*, 81, 708-717). Los polímeros de protección, como el poli (etilen glicol) (PEG), también pueden estar comprendidos en las formulaciones de partículas usadas en el contexto de la presente invención y se usan frecuentemente para estabilizar, por ejemplo, complejos de ácidos nucleicos con excipientes catiónicos contra la agregación y/o interacciones no deseadas en un entorno biológico (opsonización), por ejemplo interacciones con componentes del suero, células sanguíneas o matriz extracelular. La protección también puede ser adecuada para reducir la toxicidad de las composiciones que comprenden ácido nucleico (Finsinger et al. 2000, *Gene Ther*, 7, 1183-1192). Por ejemplo, los polímeros de protección tales como PEG se pueden acoplar covalentemente directamente a otros oligómeros o polímeros, o a lípidos o lipíoides que pueden estar presentes en las formulaciones de partículas. El acoplamiento se puede lograr en la cadena principal del polímero, preferentemente, si es factible, a los extremos terminales de una cadena principal de polímero o un dendrímero. Sin embargo, el acoplamiento también se puede lograr con los grupos amino contenidos en las fórmulas (1) a (4), (II), (III), (IV) o cualquiera de (a1), (a2) o (b1) a (b4) descrito anteriormente.

Otros ejemplares de polímeros de protección descritos en la bibliografía que pueden ser componentes útiles para una formulación de partículas que comprende un complejo de un ácido nucleico con un excipiente catiónico, incluye hidroxietil almidón (HES; Noga et al. *Journal of Controlled Release*, 2012. 159(1): 92-103, un polipéptido PAS (polipéptido Pro, Ala, Ser; Schlapschy et al. *Protein Eng Des Sei*. 2013 Agosto; 26 (8): 489-501 o Polysarcosine (Psar; Heller et al. *Macromol Biosci* 2014; 14: 1380-1395).

Los ligandos dirigidos pueden ser útiles, por ejemplo, en formulaciones de partículas para la administración de ácido nucleico para la transfección preferencial y mejorada de las células diana (Philipp and Wagner in "Gene and Cell

Therapy - Therapeutic Mechanisms and Strategy", 3rd Edition, Chapter 15. CRC Press, Taylor & Francis Group LLC, Boca Raton 2009). Un ligando dirigido puede ser cualquier compuesto que confiera a las composiciones de la presente invención una función de reconocimiento a diana y/o de unión a diana, de manera directa o indirecta. Los ejemplos de ligandos dirigidos son los análogos de prostaciclina desvelados en el documento WO 2011/076391, tal como Iloprost o Treprostinil. Un anticuerpo también puede actuar como un ligando dirigido. Como ligandos para nanopartículas o micropartículas, se pueden mencionar el ácido fólico y la N-acetil galactosamina. En términos más generales, una diana es una estructura biológica distinta, a la cual un ligando dirigido puede unirse específicamente a través de interacción molecular, y donde tal unión conducirá finalmente a la acumulación preferencial del agente terapéutico, como un ácido nucleico, comprendido en la composición en un tejido diana y/o en o dentro de una célula diana. De manera similar a las cadenas de PEG (o HES y PSar), los ligandos dirigidos se pueden acoplar, por ejemplo, a los extremos terminales de una cadena principal de polímero o un dendrímero. Sin embargo, el acoplamiento también se puede lograr con los grupos de fórmulas (1) a (4), (II), (III), (IV) o cualquiera de (a1), (a2) o (b1) a (b4) descrito arriba.

Además, agentes endosomolíticos como los péptidos endosomolíticos (Plank et al. 1998, *Adv Drug Deliv Rev*, 34, 21-35) o cualquier otro compuesto que sea adecuado para mejorar la liberación endosómica de un ácido nucleico endocitosado, son componentes útiles de las composiciones de la presente invención. De manera similar, los péptidos

de penetración celular (en otro contexto también conocidos como dominios de transducción de proteínas) (Lindgren et al. 2000, Trends Pharmacol Sci, 21, 99-103) pueden ser componentes útiles de la composición de la presente invención para mediar la administración intracelular de un ácido nucleico. El denominado péptido TAT cae dentro de esta clase y también tiene una función de localización nuclear (Rudolph et al. 2003, J Biol Chem, 278, 11411-11418).

5 *Aditivo crioprotector*

Como un componente adicional, además de la formulación de nano o micropartículas, las composiciones de acuerdo con la invención comprenden un aditivo crioprotector que se selecciona de alcanos C3-C5 sustituidos por uno o dos grupos hidroxilo. Como entenderá el lector experto, estos alcanos sustituidos pueden ser alcanos lineales o ramificados. Tienen de 3 a 5 átomos de carbono. En función del número de sustituyentes hidroxilo, pueden denominarse mono o dialcoholes, o como alcanos o alcanodiolos.

10

Preferentemente, el aditivo crioprotector comprende al menos un grupo hidroxilo secundario (por ejemplo, un grupo hidroxilo secundario y no más, o un grupo hidroxilo secundario y uno primario, o dos grupos hidroxilo secundarios).

Con mayor preferencia, el aditivo crioprotector se selecciona entre 1,2-propanodiol, 2-propanol, 1,2-butanodiol y 1,3-butanodiol. Con la máxima preferencia, el aditivo crioprotector es 1,2-propanodiol.

15 *Composiciones*

Como se señaló anteriormente, la invención hace uso de una composición de suspensión que comprende la formulación de nano o micropartículas del agente terapéuticamente activo y el aditivo crioprotector que se han discutido con más detalle anteriormente.

20 Dado que las composiciones para su uso en la invención contienen un agente terapéuticamente activo y son adecuadas para la administración del agente terapéuticamente activo a un paciente, pueden denominarse composiciones terapéuticas o composiciones farmacéuticas.

En particular, la composición de suspensión para su uso en la presente invención comprende:

(i) una formulación de nano o micropartículas de un agente terapéuticamente activo que está suspendida en una fase líquida, y

25 (ii) al menos un aditivo crioprotector seleccionado de alcanos C3-C5 sustituidos por uno o dos grupos hidroxilo.

Como se apreciará, la información relativa a realizaciones adecuadas y preferentes del agente terapéutico, de su formulación de partículas y del aditivo crioprotector continúa aplicándose en este contexto.

30 La composición en suspensión comprende preferentemente las partículas de la formulación de partículas en una cantidad que proporcione el agente terapéuticamente activo, que está contenido en la formulación de partículas, a una concentración de 0,01 a 50 mg/ml, con mayor preferencia de 0,02 a 30 mg/ml, con base en el volumen total de la composición.

35 El aditivo crioprotector está contenido preferentemente en la composición en suspensión a una concentración de 0,5 a 50 % p/v, con mayor preferencia de 1 a 40 % p/v, con la máxima preferencia de 1 a 30 % p/v, donde el valor porcentual indica el peso del aditivo crioprotector en g por 100 ml del volumen total de la composición. Típicamente, el aditivo crioprotector está contenido, preferentemente disuelto, en la fase líquida en la que se suspende la formulación de partículas. Sin embargo, también puede estar asociado parcialmente con las partículas suspendidas en la fase líquida.

40 La fase líquida de la composición en suspensión para su uso en la presente invención típicamente contiene agua como disolvente. Preferentemente, el agua proporciona el 50 % o más, con mayor preferencia el 70 % o más en volumen (en base al volumen total de la fase líquida a 20 °C). Con mayor preferencia, el agua y el aditivo crioprotector son los únicos disolventes contenidos en la fase líquida.

Como ejemplares de aditivos opcionales adicionales de la fase líquida, se pueden mencionar uno o más seleccionados de sales, azúcares, disolventes orgánicos y tampones.

45 Como implica el término "suspendido", la formulación de nano o micropartículas del agente terapéuticamente activo forma una fase sólida discontinua en la fase líquida continua.

Generalmente, es preferente que la composición en suspensión se proporcione como una composición de suspensión de dos fases, con una fase líquida continua que comprende el aditivo crioprotector, opcionalmente en combinación con otros aditivos disueltos en el mismo, y la formulación de nano o micropartículas del agente terapéuticamente activo suspendido como una fase sólida discontinua en el mismo.

50 La composición en suspensión puede almacenarse en forma de una composición sólida que comprende (i) una formulación en nanopartículas o micropartículas del agente terapéuticamente activo, y

(ii) al menos un aditivo crioprotector seleccionado de alcanos C3-C5 sustituidos por uno o dos grupos hidroxilo, y que puede obtenerse por la congelación de la composición en suspensión.

La composición sólida contiene los mismos componentes que la composición en suspensión, la que se pueden congelar para obtener la composición sólida. Por lo tanto, la información relativa a realizaciones adecuadas y preferentes del agente terapéutico, de su formulación de partículas, del aditivo crioprotector, y de la fase líquida y sus componentes proporcionados para la composición en suspensión continúa aplicándose a la composición sólida. Sin embargo, como apreciará el lector experto, la composición sólida y la composición en suspensión difieren en que la fase líquida de la composición en suspensión se ha solidificado en la composición sólida. En esa medida, la composición sólida contiene una dispersión de la formulación de nano o micropartículas del agente terapéutico en una fase sólida continua de un líquido congelado. De acuerdo con lo anterior, el aditivo crioprotector está contenido típicamente en la fase continua en la que se dispersa la formulación de partículas.

En vista de lo anterior, resultará más evidente que las composiciones también son preferentes como la composición en suspensión para su uso de acuerdo con la invención que comprenden (i) una formulación de nano o micropartículas en la que el agente terapéuticamente activo es ARNm, y el ARNm está comprendido en la formulación de partículas en forma de complejo con un polímero u oligómero catiónico, o en forma de complejo con un lípido catiónico o un lipidoide catiónico, y (ii) 1,2 propanodiol como un aditivo crioprotector. Con respecto a los tipos adecuados y preferentes del polímero u oligómero catiónico, y con respecto a los tipos preferentes de lípidos catiónicos y lípidos catiónicos, se siguen aplicando las consideraciones anteriores. También, para estas composiciones preferentes, las partículas en la formulación de partículas muestran típicamente un diámetro promedio de partículas en el intervalo de 1 a 4.000 nm, con mayor preferencia de 2 a 2.500 nm y con la máxima preferencia de 5 a 1.000 nm. El límite superior para el diámetro de las partículas en la formulación de nano o micropartículas es preferentemente de 20 μm , con más preferencia de 10 μm y con la máxima preferencia de 5 μm .

Aspectos farmacéuticos

La composición en suspensión para su uso en la presente invención es adecuada para administrar el agente terapéuticamente activo contenido en el mismo a un individuo. Como se explicó anteriormente, la composición tiene la ventaja inesperada, en comparación con las composiciones de partículas que contienen otros crioprotectores, de que se puede mantener en un estado congelado, mientras se previene la agregación de las partículas durante o después de la congelación, y mientras se administra la funcionalidad a la vía respiratoria se mantiene el tracto, en particular la administración pulmonar o la administración nasal. Por lo tanto, una vía de administración preferente para la composición en suspensión es la administración al tracto respiratorio o a través de este, en particular la administración pulmonar o la administración nasal.

El agente terapéuticamente activo es un ácido nucleico, preferentemente ARN, con mayor preferencia un ARN monocatenario, y con la máxima preferencia ARNm, y el ácido nucleico puede ser administrado a las células diana en el tracto respiratorio o a través de este. El término "administrado a las células diana" significa preferentemente transferencia del ARN, preferentemente ARN monocatenario tal como ARNm, en la célula.

La composición puede ser administrada al sujeto en una dosis adecuada. El régimen de dosificación será determinado por el médico de cabecera y los factores clínicos. Como se conoce bien en la técnica médica, las dosificaciones para cada sujeto dependen de muchos factores, incluido el tamaño del sujeto, el área de superficie corporal, la edad, el compuesto en particular que se administrará, el sexo, el tiempo y la vía de administración, la salud general, y otros fármacos que se administren simultáneamente. Una dosis típica de sustancias terapéuticamente activas puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 1 ng a varios gramos. Aplicado al caso preferente de terapia con ARN(m), la dosificación de un ARN(m) para la expresión o para la inhibición de la expresión debe corresponder a este intervalo; sin embargo, se prevén dosis por debajo o por encima de estos ejemplares de intervalos, especialmente considerando los factores antes mencionados. Generalmente, el régimen como una administración regular de la composición farmacéutica debe estar en el intervalo de 0,01 pg a 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal por día. Si el régimen es una infusión continua, también debe estar en el intervalo de 1 pg a 10 mg unidades por kilogramo de peso corporal, respectivamente. El progreso puede monitorearse mediante evaluación periódica. La dosificación variará, pero una dosis preferente para la administración de ARN(m) como constituyente de la composición de la presente invención es de aproximadamente de 10^6 a 10^{19} copias de la molécula de ARN(m).

Los dispositivos para formar un aerosol a partir de una composición particulada suspendida en un líquido o para nebulizar dicha composición son conocidos en la técnica y están disponibles comercialmente. Pueden usarse para lograr la administración de la composición en suspensión para su uso de acuerdo con la invención en el tracto respiratorio o a través de este, en particular la administración pulmonar. Para la administración a través de la nariz, se puede usar, por ejemplo, un dispositivo de pulverización nasal o de infusión nasal.

Por lo tanto, un aspecto de la presente invención se refiere a un dispositivo para formar un aerosol a partir de una composición particulada suspendida en un líquido o para nebulizar dicha composición, cuyo dispositivo comprende la composición en suspensión para su uso de acuerdo con la presente invención. El dispositivo es preferentemente un inhalador seleccionado de un inhalador de dosis medida, un nebulizador y un dispositivo de pulverización nasal.

También, para las composiciones utilizadas en los dispositivos anteriores, la información proporcionada anteriormente sobre realizaciones preferentes continúa aplicándose. Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones en suspensión preferentes usadas en tales dispositivos comprenden (i) una formulación de nano o micropartículas en la que el agente terapéuticamente activo es ARNm, y el ARNm está comprendido en la formulación de partículas en la forma de un complejo con un polímero catiónico u oligómero, o en la forma de complejo con un lípido catiónico o un lipidoide catiónico, y (ii) 1,2 propanodiol como un aditivo crioprotector. Con respecto a los tipos adecuados y preferentes del polímero u oligómero catiónico, y con respecto a los tipos preferentes de lípidos catiónicos y lípidos catiónicos, se siguen aplicando las consideraciones anteriores. También, para estas composiciones preferentes, las partículas en la formulación de partículas muestran típicamente un diámetro promedio de partículas en el intervalo de 1 a 4.000 nm, con mayor preferencia de 2 a 2.500 nm y con la máxima preferencia de 5 a 1.000 nm. El límite superior para el diámetro de las partículas en la formulación de nano o micropartículas es preferentemente de 20 μm , con más preferencia de 10 μm y con la máxima preferencia de 5 μm .

Como se explicó anteriormente, las composiciones en suspensión para su uso de acuerdo con la invención se pueden administrar convenientemente después de la preparación, almacenamiento en estado congelado, y recuperación mediante descongelación. Sin embargo, se comprenderá que las composiciones en suspensión para su uso de acuerdo con la invención también pueden administrarse directamente después de su preparación, y se ha encontrado que la presencia del alcano C3-C5 sustituido con uno o dos grupos hidroxilo puede tener un efecto beneficioso sobre la eficiencia del agente terapéutico que es un ácido nucleico, preferentemente ARN, más preferentemente ARN monocatenario, y más preferentemente ARNm, incluso en una composición recién preparada.

Por lo tanto, la presente invención también proporciona la composición en suspensión de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, preferentemente en la que la composición se administra al tracto respiratorio o a través de este. Preferentemente, la composición es para ser administrada a través de administración pulmonar o mediante administración nasal. Los pacientes a los que se puede administrar la composición comprenden animales y humanos.

También, la presente invención hace posible un procedimiento de tratamiento, que comprende administrar la composición en suspensión de la presente invención a un paciente a través de la administración al tracto respiratorio o a través de este, con preferencia a través de la administración pulmonar o nasal, con el fin de tener el agente terapéuticamente activo contenido en dicha composición lo que causa un efecto preventivo o terapéutico. También, en este contexto, el término "paciente" comprende animales y humanos.

También, para las composiciones de acuerdo con la presente invención para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad, continúa aplicándose la información proporcionada anteriormente sobre las realizaciones preferentes. Por lo tanto, por ejemplo, las composiciones en suspensión preferentes para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad comprenden (i) una formulación de nano o micropartículas en la que el agente terapéuticamente activo es ARNm, y el ARNm está comprendido en la formulación de partículas en la forma de un complejo con un polímero u oligómero catiónico, o en la forma de un complejo con un lípido catiónico o un lipidoide catiónico, y (ii) 1,2 propanodiol como un aditivo crioprotector. Con respecto a los tipos adecuados y preferentes del polímero u oligómero catiónico, y con respecto a los tipos preferentes de lípidos catiónicos y lípidos catiónicos, se siguen aplicando las consideraciones anteriores. También, para estas composiciones preferentes, las partículas en la formulación de partículas muestran típicamente un diámetro promedio de partículas en el intervalo de 1 a 4.000 nm, con mayor preferencia de 2 a 2.500 nm y con la máxima preferencia de 5 a 1.000 nm. El límite superior para el diámetro de las partículas en la formulación de nano o micropartículas es preferentemente de 20 μm , con más preferencia de 10 μm y con la máxima preferencia de 5 μm .

Como se indicó anteriormente, la administración se puede lograr directamente después de la preparación de la composición, pero el efecto del aditivo crioprotector es pronunciado si la administración se logra después que la composición en suspensión se haya congelado y descongelado al menos una vez.

Al administrar la composición en suspensión para su uso en la presente invención, se pueden tratar o prevenir enfermedades. El término "enfermedad" se refiere a cualquier condición patológica concebible que pueda tratarse, prevenirse o vacunarse al emplear la composición de la presente invención. Dichas enfermedades pueden, por ejemplo, ser heredadas, adquiridas, infecciosas o no infecciosas, relacionadas con la edad, cardiovasculares, metabólicas, intestinales, neoplásicas (en particular cáncer) o genéticas. Una enfermedad puede basarse, por ejemplo, en irregularidades de procesos fisiológicos, procesos moleculares, reacciones bioquímicas dentro de un organismo que a su vez pueden basarse, por ejemplo, en el equipamiento genético de un organismo, en factores conductuales, sociales o ambientales tales como la exposición a los productos químicos o la radiación. La composición en suspensión de acuerdo con la presente invención es particularmente adecuada para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad pulmonar.

Si, de acuerdo con una realización preferente descrita anteriormente, el agente terapéuticamente activo es ARN, con mayor preferencia ARN monocatenario y con la máxima preferencia ARNm, la composición en suspensión de la presente invención puede ser para su uso en una terapia basada en ARN. La molécula de ARN, preferentemente la molécula de ARNm, comprende una secuencia que codifica una proteína y, en consecuencia, se puede usar en terapias basadas en ARN en las que el ARN, preferentemente el ARNm, codifica un polipéptido o proteína terapéutica

o farmacéuticamente activo que tiene un efecto terapéutico o preventivo. Por lo tanto, en realizaciones preferentes, la composición en suspensión de la presente invención puede ser para su uso en terapias basadas en ARN, en el tratamiento o la prevención de una enfermedad como se indica en la siguiente tabla. Por consiguiente, las terapias basadas en ARN de acuerdo con la presente invención pueden ser para su uso en el tratamiento o la prevención de una enfermedad como se indica en la siguiente tabla.

Por lo tanto, la composición en suspensión de la presente invención puede ser para su uso en terapias basadas en ARN, en los casos en los que los defectos genéticos descritos en la siguiente tabla conducen a una enfermedad que luego puede ser tratada o prevenida mediante una terapia de reemplazo de un transcrito/terapia de reemplazo de enzima con la molécula de ARN, preferentemente la molécula de ARNm, de la presente invención, en la que la molécula de ARN codifica una versión intacta de la proteína o un fragmento funcional de la misma, lo que compensa el gen defectuoso desvelado.

En otras realizaciones, la composición en suspensión de la presente invención puede ser para su uso en terapias basadas en ARN de acuerdo con la presente invención en donde el ARN, preferentemente el ARNm, codifica un polipéptido, una proteína o un péptido terapéutica o farmacéuticamente activo, que tiene un efecto terapéutico o preventivo, en el que dicho polipéptido, proteína o péptido se selecciona del grupo codificado por los genes como se indica en la siguiente tabla.

La composición en suspensión de la presente invención es particularmente adecuada para su uso en terapias basadas en ARN en el tratamiento o la prevención de enfermedades pulmonares. Como ejemplares de enfermedades, se pueden mencionar la alfa-1-antitripsina, el asma, la fibrosis quística, la disfunción del metabolismo del surfactante o la disquinesia ciliar primaria, como se enumeran en la siguiente tabla.

En otros ejemplares de realización, la composición en suspensión de la presente invención puede ser para su uso en terapias basadas en ARN en el tratamiento o la prevención de enfermedades lisosomales, como la enfermedad de Gaucher, la enfermedad de Fabry, la MPS I, la MPS II (síndrome de Hunter), la MPS VI y las enfermedades de almacenamiento del glucógeno, como por ejemplo, la enfermedad de almacenamiento del glucógeno tipo I (la enfermedad de von Gierecke), tipo II (la enfermedad de Pompe), tipo III (la enfermedad de Cori), tipo IV (la enfermedad de Andersen), tipo V (la enfermedad de McArdle), tipo VI (la enfermedad de Hers), tipo VII (la enfermedad de Tauri), tipo VII, tipo IX, tipo X, tipo XI (el síndrome de Fanconi-Bickel), tipo XI o tipo 0. Las terapias de reemplazo de transcripciones/terapias de reemplazo de enzimas beneficiosas no afectan el defecto genético subyacente, pero aumentan la concentración de la enzima en la que el paciente es deficiente. Como un ejemplo, en la enfermedad de Pompe, la terapia de reemplazo de transcripción/terapia de reemplazo de enzima reemplaza la deficiencia de la enzima lisosomal alfa-glucosidasa ácida (GAA).

De acuerdo con otros ejemplos, las terapias basadas en ARN de acuerdo con la presente invención pueden ser para su uso en el tratamiento del cáncer, una enfermedad cardiovascular, una infección viral, una disfunción inmunológica, una enfermedad autoinmune, un trastorno neurológico, un trastorno metabólico hereditario o un trastorno genético o cualquier enfermedad donde una proteína o un fragmento de proteína producido en una célula pueda tener un efecto beneficioso para el paciente. Los ejemplos de cáncer incluyen cáncer de cabeza y cuello, cáncer de mama, cáncer renal, cáncer de vejiga, cáncer de pulmón, cáncer de próstata, cáncer de hueso, cáncer de cerebro, cáncer de cuello uterino, cáncer de ano, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer de apéndice, cáncer de ojo, cáncer gástrico, leucemia, linfoma, cáncer de hígado, cáncer de piel, cáncer de ovario, cáncer de pene, cáncer de páncreas, cáncer de testículo, cáncer de tiroides, cáncer de vagina, cáncer de vulva, cáncer de endometrio, cáncer cardíaco y sarcoma. Los ejemplos de enfermedades cardiovasculares incluyen aterosclerosis, enfermedad cardíaca coronaria, enfermedad cardíaca pulmonar y cardiomiopatía. Los ejemplos de disfunciones inmunes y enfermedades autoinmunes incluyen, pero no se limitan a, enfermedades reumáticas, esclerosis múltiple y asma. Algunos ejemplos de infecciones víricas incluyen, pero sin limitación, las infecciones por el virus de la inmunodeficiencia humana, el virus del herpes simple, el virus del papiloma humano, así como los virus de la hepatitis B y C. Los ejemplos de trastornos neurológicos incluyen, pero sin limitación, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple, y la demencia. Los ejemplos de trastornos metabólicos hereditarios incluyen, pero no se limitan a, la enfermedad de Gaucher y la Fenilcetonuria.

Tabla: Ejemplos no limitativos de genes humanos y trastornos genéticos

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Enfermedades de la sangre		
Anemia de Fanconi	Anemia y neutropenia, evidencia de que un mecanismo de reparación del ADN está afectado	FANCA, autosómica recesiva
Hemofilia-A	Sangrado anormal	Factor de coagulación VIII, cromosoma X recesiva

ES 2 960 939 T3

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Hemofilia-B	Sangrado anormal	Factor de coagulación IX, cromosoma X recesiva
Esferocitosis hereditaria (varios tipos)	eritrocitos de forma esférica (esferocitos)	Anquirina (ANK1)
Paroxística nocturna hemoglobinuria	Anemia y presencia de sangre en la orina.	PIG-A, cromosoma X
Porfiria cutánea tarda	Sobreproducción de hemo, sobrecarga de hierro	Uroporfirinógeno descarboxilasa (UROD), autosómica recesiva
Inmunodeficiencia severa combinada (SCID)	Debido a la alteración de la síntesis de ADN grave inmunodeficiencia en la inmunidad humoral y celular	Adenosina desaminasa, autosómica recesiva, IL-2R- γ , JAK3, (IL-7R- α , RAG1/2, Artemis, CD35, CD3e
Anemia falciforme	Hemoglobina anormal (HbS)	β -Hemoglobina (HB), autosómico recesivo
Talasemia (forma α y β)	Falta de hemoglobina α o β resultante en anemia	Eliminación de HBA1 y/o HBA2,
Enfermedad de Von Willebrand (se conocen tres tipos, el tipo III es el más grave)	Sangrado anormal, hemorragia similar a la hemofilia A y B	Formas autosómicas dominantes y recesivas
Cáncer		
Melanoma maligno	La mutación P16 conduce a la proliferación descontrolada de fibroblastos	Inhibidor de quinasa dependiente de Ciclina 2 (CDKN2)
Neurofibromatosis (2 tipos)	Los tumores benignos en los nervios auditivos provocan sordera	NF1, NF2, autosómico dominante
Sordera (oído)		
Sordera	Pérdida de la audición	Sordera-1A (DFNB1), autosómica recesiva
Síndrome de Pendred	Pérdida de la audición	Pendrina (PDS), autosómica recesiva
Corazón		
Ataxia telangiectasia	Reparación de daños en ADN, perturbado,	ATM,
Aterosclerosis	Aumento del colesterol en sangre	apoE,
Síndrome de LQT (QT largo)	Canal de potasio defecto	LQT1 y otros genes
Síndrome de von-Hippel Lindau	Crecimiento anormal de vasos sanguíneos, que puede provocar cáncer.	VHL, autosómico dominante
Síndrome de William Beuren	La delección de elastina da como resultado defectos vasculares, estenosis aórtica supraavalvular	Delección de genes de elastina y LIM quinasa

ES 2 960 939 T3

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Trastornos metabólicos y enfermedades por almacenamiento del glucógeno		
Adrenoleucodistrofia	Transporte y metabolismo de ácidos grasos alterados	ABCD1, cromosoma X
Alcaptonuria	Defecto del metabolismo del nitrógeno, la orina se oscurece cuando se expone al oxígeno	Oxidasa homogentísica, autosómica recesiva
Diabetes tipo I	Producción alterada de insulina	IDDM1, IDDM2, GCK, ...
Galactosemia	trastorno del metabolismo de la galactosa	Gen de la galactosa-1-fosfato uridiltransferasa (GALT), autosómico
Enfermedad de Gaucher	Alteración del metabolismo de las grasas	Glucocerebrosidasa
Glucosa Galactosidasa Malabsorción	Transporte alterado de glucosa y galactosa fuera de la luz intestinal que resulta en diarrea	SGLT1, autosómica recesivo
Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo I, enfermedad de Von-Gierke	Acumulación de glucosa en hígado y riñón	Glucosa-6-Fosfatasa, autosómica recesiva
Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo II, enfermedad de Pompe	Acumulación de glucógeno en hígado, corazón, músculo esquelético, cardiomegalia	α -1-Glucosidasa, autosómica recesiva
Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo III, enfermedad de Cori	Acumulación de glucógeno en hígado, corazón, músculo esquelético, hepatomegalia	Enzima desramificadora, autosómico recesivo
Enfermedad por almacenamiento de glucógeno tipo V, enfermedad de McArdle	No se puede usar el glucógeno en las células musculares.	Fosforilasa muscular, autosómico recesivo
Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa	La incapacidad para mantener el glutatión conduce a anemia hemolítica	G6PD, cromosoma X recesiva
Hemocromatosis hereditaria (4 tipos)	Exceso de hierro en el cuerpo (especialmente hígado) debido a una absorción excesiva de hierro en el intestino	Hemocromatosis (HFE)
Homocistinuria	Defecto del metabolismo del nitrógeno	Defecto de la cistación sintetasa, autosómica recesiva
Síndrome de Lesch Nyhan	Acumulación de ácido úrico que conduce a gota, cálculos de ureato y	HPRT1, cromosoma X
	pérdida muscular	

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Enfermedad de la Orina con Jarabe de Arce	El defecto del metabolismo de los aminoácidos conduce a la acumulación de α -cetoácidos, y a la muerte en los primeros meses si no se trata	Alfa deshidrogenasa de cadena ramificada (BCKDH)
Síndrome de Menkes	Capacidad reducida para absorber cobre, conduce a la muerte en la infancia si no se trata	ATP7A, cromosoma X recesiva
Obesidad	Peso corporal elevado	Los niveles elevados de leptina poligénica pueden influir
Fenilcetonuria	Incapacidad para descomposición de Fenilalanina en la tirosina provoca retraso mental	Fenilalanina hidroxilasa (PAH), autosómica recesiva
Enfermedad de Tangier	niveles reducidos de lipoproteínas de alta densidad en el plasma	Gen del casete 1 de unión a ATP (ABCA1)
Síndrome de Zellweger (conduce a la muerte en los bebés)	Niveles altos de hierro y cobre en sangre	PXR1 (receptor en la superficie de los peroxisomas)
Enfermedad de Wilson	Acumulación de cobre en el cerebro y el hígado	ATP7B (ATPasa tipo P), autosómica recesiva
Sistema musculoesquelético		
Acondroplasia	Estatura baja con cabeza grande debido a la lenta proliferación de condrocitos	Receptor 3 del factor de crecimiento de fibroblastos (FGF3R),
Síndrome de Charcot-Marie-Tooth y su forma más grave Síndrome de Dejerine-Sottas	Degeneración de los músculos de las extremidades	Diferentes formas causadas por diferentes mutaciones genéticas, autosómica recesiva y cromosoma X
Síndrome de Cockayne (tipo 2)	Envejecimiento prematuro y baja estatura, pérdida de la reparación "sobre la marcha" del ADN	proteína de complemento cruzado de reparación de escisión del grupo 8 (ERCC8)
Displasia condroectodérmica	Malformación de huesos y polidactilia	EVC, autosómica recesiva
Displasia diastrófica (DTD)	Manos malformadas, defecto de transportador de sulfato	Gen DTDST
distrofia muscular de Duchenne	Agrandamiento del tejido muscular con posterior pérdida de función	DMD-A, cromosoma X recesivo
Fibrodiasplasia Osificante Progresiva	Formación de hueso heterotópico	NOG, BMP, autosómica dominante
Ataxia de Friedreich	Agrandamiento del corazón y pérdida progresiva de la coordinación muscular	Frataxina, autosómica recesiva

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Hipofosfatasa	Producción de una versión anormal de fosfatasa alcalina que afecta al proceso de mineralización	ALPL, autosómica recesiva
Síndrome de Marfán	Trastorno del tejido conjuntivo por deficiencia de fibrilina	Fibrilina 1 (FBN), autosómica dominante
Distrofia miotónica (inicio durante la edad adulta temprana)	Defecto de la proteína quinasa en las células del músculo esquelético	Distrofia miotónica proteína quinasa (DMPK), autosómica dominante
Osteogénesis imperfecta (varios tipos)	Un defecto en la formación del colágeno de tipo I provoca fracturas múltiples después del nacimiento	COL1A1, COL1A2
Síndrome de Prader-Willi	Disminución del tono muscular y retraso mental	SNRPN (ribonucleoproteína N pequeña) eliminada debido a una deleción en el cromosoma 15
Neuronas y cerebro		
Enfermedad de Alzheimer	Aumento de la producción de amiloide, incapacidad progresiva para recordar hechos	Poligénico, PS1, PS2,...
Esclerosis lateral amiotrófica (ALS) (varias formas)	Degeneración progresiva de las células de las neuronas motoras (defecto en la eliminación de radicales superóxido)	Superóxido dismutasa 1 (SOD1), varios genes implicados
Síndrome de Angelman	Retraso mental con risa inadecuada	Impresión genómica en el cromosoma 15
Piruvato deshidrogenasa	Defectos neurológicos si no se trata	Piruvato deshidrogenasa, autosómica recesiva
Enfermedad de Refsum	La acumulación de ácido fitánico conduce a una neuropatía periférica	Fitanoil-CoA hidroxilasa (PHYH), autosómica recesiva
Síndrome de Rett	Retraso mental con desarrollo detenido entre los 6 y los 18 meses de edad	La proteína 2 de unión a metil-CpG (MECP2), cromosoma X dominante
Enfermedad de Tay-Sachs (varias formas de gravedad)	La descomposición alterada del gangliósido GM2 conduce a daño neurológico	HEXA (β-hexosaminidas A), autosómica recesiva
Enfermedad de LaFora	Forma agresiva de epilepsia	EPM2A, autosómica
Temblor esencial (formas variables)	Temblor incontrolable	ETM1, ETM2, autosómica dominante

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Síndrome X Frágil	Falta de proteína de unión a ARN FMR1, retraso mental	El gen FMR1 no se expresa debido a una amplificación CGG en la región 5'UTR
Enfermedad de Huntington	Demencia progresiva que comienza en la edad adulta	HTT (huntingtina), autosómica dominante
Intestino		
Síndrome de Bartter (3 tipos)	Enfermedad renal	Gen del canal B del cloruro de riñón (CLCNKB), autosómica recesiva
Enfermedad renal poliquística (tipo 2)	enfermedad renal	PDK1, PDK2, autosómica dominante, también se conoce una forma autosómica recesiva (ARPKD)
Pulmón		
Alfa-1-antitripsina	Alvéolos defectuosos debido a la liberación incontrolada de elastasa	SERPINA1, autosómica codominante
Asma	Trastorno inflamatorio crónico de las vías respiratorias	Poligénico
Fibrosis quística	Mucosidad excesivamente viscosa debido al transporte defectuoso de iones CP	CFTR (regulador transmembrana de la conductancia de la fibrosis quística), autosómica recesiva
Disfunción del metabolismo de los tensioactivos (varios tipos)	Los recién nacidos tienen un peso corporal normal, pero no ganan peso	Transportador (ABCA3) de casete de unión a ATP
Disquinesia ciliar primaria	Mucosidad excesivamente viscosa debida a función ciliar defectuosa/ausente	DNAI1, CCNO, CCDC40 entre otros
Enfermedad por almacenamiento en los Lisosomas		
Enfermedad de Fabry	Más allá de otras, lesiones cutáneas por acumulación de ceramida trihexósido	α-Galactosidasa A, cromosoma X recesiva
Enfermedad de Gaucher Tipo-I: forma adulta (vida útil normal bajo tratamiento) Tipo II: forma infantil (muerte antes de 1 año) Tipo III: forma juvenil (inicio en la primera infancia, menos grave que el Tipo II)	La acumulación de glucocerebrósidos (gangliósidos, esfingolípidos)	Glucocerebrosidasa, autosómica recesiva,
Síndrome de Hunter	La acumulación de mucopolisacáridos	L-iduronosulfat sulfatasa, cromosoma X recesiva
Síndrome de Hurler (muerte a los 10 años)	La acumulación de mucopolisacáridos	α-L-iduronidasa, autosómica recesiva

ES 2 960 939 T3

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Enfermedad de Niemann-Pick (tres formas distintas A, B, C)	Defecto en la liberación de colesterol de lisosomas, acumulación de Esfingomielina	Esfingomielinasa, autosómica recesiva
Enfermedad de Tay-Sachs (muerte a los 4 años)	La acumulación del gangliósido G _{M2} en las células neuronales	Hexosaminidasa A, autosómico recesivo
Piel		
Albinismo	Defecto del metabolismo del nitrógeno	Deficiencia de tirosinasa, autosómico recesivo
Albinismo, oculocutáneo, tipo II	Biosíntesis reducida del pigmento de melanina	OCA2, autosómica recesiva
Síndrome de Ehlers-Danlos (varios tipos)	Hernia de diafragma, común, desprendimiento de retina	Varios defectos en la síntesis de colágeno
Epidermólisis ampollosa (varios tipos, incluidos EB simple, EB de Unión, EB Distrófica y síndrome de Kindler)	Defectos en el mantenimiento de los queratinocitos estabilidad estructural o la adhesión del queratinocito a	Epidermólisis bullosa tipo macular (EBM), Epidermólisis bullosa 3 progresiva (EBR3), Epidermólisis bullosa 4
	dermis subyacente	pseudojuncional (EBR4), Desmoplaquina (DSP), Placofilina-1 (PKP1), kreatina (KRT5, KRT14), plectina (PLEC), ITGA6, subunidad de integrina (ITGB4), subunidades de laminina (LAMA3, LAMP3, LAMB3, LAMC2), colágeno (COL17A1, COL7A1 (autosómico dominante), FERMT1, autosómico recesivo
Enfermedad de Hartnup	Defecto en la captación de triptófano en el tracto gastrointestinal, piel fotosensible	SLC6A19, autosómica
Telangiectasia hemorrágica hereditaria, síndrome de Osler-Weber-Rendu	Telangiectasia de la piel y las membranas mucosas	Endogлина (ENG), autosómica dominante
Hipercolesterolemia familiar	elevación del colesterol sérico unido a lipoproteínas de baja densidad, acumulación en la piel y arteriosclerosis	Receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDLR), APOB, autosómico dominante
Xeroderma pigmentosa E	defecto de la piel y melanoma debido a la exposición a los rayos UV	Defecto en la reparación del ADN, autosómica recesiva
Calvicie de patrón masculino	Conversión alterada de testosterona en dihidrotestosterona en la piel	5-α-reductasa
Enfermedades genéticas del hígado		

ES 2 960 939 T3

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Trastornos del metabolismo de los aminoácidos	Interrupciones en el proceso multietapa que descompone el aminoácido tirosina y fenilalanina.	FAH, TAT, HPD, autosómico recesivo
Beta-talasemia intermedia	Escasez de glóbulos rojos maduros	HBB, autosómica recesiva
Síndrome de Crigler-Najjar	Deficiencia de glucuronidación en la que la bilirrubina se disuelve en agua	UGT1A1, autosómica recesiva
Trastornos de la oxidación de los ácidos grasos	Deficiencia en el procesamiento de los ácidos grasos de cadena larga y los ácidos grasos de cadena muy larga que resulta en letargo e hipoglucemia	HADHA, ACADVL autosómico recesivo
Trastornos en el metabolismo de la fructosa	Gluconeogénesis alterada que causa hipoglucemia	FBP1, ALDOB, autosómica recesiva
Galactosemia	Deficiencia en procesamiento de galactosa	GALT, GALK1, GALE, autosómica recesiva
Enfermedades por almacenamiento del glucógeno	Degradación perturbada	G6PC, SLC37A4, AGL,
	de glucosa 6-fosfato y glucógeno conduce a la acumulación de glucógeno, así como glucógeno anormal moléculas causantes del daño celular	GBE1, autosómica recesivo
Trastorno de biosíntesis de hemo	Disminución de uroporfirinógeno descarboxilasa resultante de la acumulación de compuestos denominados porfirinas causantes de niveles tóxicos en el hígado	UROD autosómico dominante, ALAS2 dominante en X, ALAD autosómico recesivo
Trastornos del metabolismo (transporte) de lípidos	Escasez de proteína funcional, que impide el movimiento de colesterol y otros lípidos, lo que provoca su acumulación en las células	NPC1, NPC2 autosómica recesiva, LDLR, autosómica dominante
Trastornos del metabolismo de los metales	Trastornos en el almacenamiento y el transporte de hierro y cobre que provoca acumulación en tejidos y órganos.	ATP7B, HAMP, HFE, HFE2, autosómica recesiva

Enfermedad	Patología	Gen, herencia
Trastornos de los ácidos orgánicos (Acidurias/Acidemias)	Descomposición interrumpida de varios componentes básicos de proteínas (aminoácidos), ciertos lípidos y colesterol	BCKDHA, BCKDHB y DBT, PCCA y PCCB, MUT, MMAA, MMAB, MMADHC, MCEE, IVD, MCCC1 o MCCC2, autosómica recesiva
Hiperoxaluria primaria tipo 1	Desglose interrumpido del glioxilato que conduce a daño renal	AGXT, GRHPR, autosómica recesiva
Colestasis intrahepática familiar progresiva	Acumulación de ácidos biliares en las células del hígado que causan daño hepático	ATP8B1, autosómica recesiva
Trastorno de la actividad de los trombocitos	La falta de actividad enzimática altera el equilibrio habitual entre sangrado y coagulación	ADAMTS13, autosómica recesiva
Trastornos del ciclo de la urea	El trastorno del ciclo de la urea que causa una forma de hiperamonemia	OTC (trastorno ligado al cromosoma X), CPS1, ASS1 y SLC25A13, ASL, autosómico recesivo

Procedimientos de preparación

La composición para su uso de acuerdo con la presente invención puede prepararse mediante un proceso que comprende

- 5 a) proporcionar una formulación de nano o micropartículas de un agente terapéuticamente activo, que está suspendida en una fase líquida, y
- b) añadir al menos un aditivo crioprotector seleccionado de alcanos C3-C5 sustituidos por uno o dos grupos hidroxilo a la fase líquida, en el que la adición del aditivo crioprotector a la fase líquida se puede lograr antes, durante o después de proporcionar la formulación de partículas suspendida en la fase líquida,

10 Con respecto a la provisión de una formulación de partículas de un agente terapéuticamente activo el cual comprende nanopartículas o micropartículas, las técnicas están establecidas en la técnica.

Con respecto a los procesos para la provisión de formulaciones de partículas de ácido nucleico como un agente terapéutico, preferentemente ARN, con mayor preferencia ARN monocatenario y con la máxima preferencia ARNm, se puede hacer referencia nuevamente a la bibliografía discutida anteriormente, tal como A.C. Silva et al., *Current Drug Metabolism*, 16, 2015, 3-16, y la bibliografía a la que se hace referencia en este, J.C. Kasper et al., *J. Contr. Rei.* 151 (2011), 246-255, el documento WO 2014/207231 y la bibliografía mencionada en el mismo, el documento WO 2016/097377 y en la bibliografía mencionada en el mismo, los documentos US 2017/0267631, WO 2016/081029, WO 2011/071860, WO 2016/118697, US 8450298 B2 y E.R. Lee et al., *Human Gene Therapy* 7:1701-1717, September 10, 1996.

20 Las formulaciones de partículas preferentes que contienen ácido nucleico, preferentemente ARN, con mayor preferencia ARN monocatenario, y con la máxima preferencia ARNm como agente activo en forma de un complejo con un polímero catiónico, oligómero, lípido o lipidoide, como poliplexos, lipoplexos, liposomas o LNP, pueden formarse convenientemente mediante el uso de un autoensamblaje de un ácido nucleico cargado negativamente con un oligómero, polímero, lípido o lipidoide cargado positivamente.

25 El autoensamblaje puede ocurrir al mezclar las soluciones de los componentes. El autoensamblaje se puede lograr, por ejemplo, mediante la mezcla a mano con el uso de pipeta y agitación/agitación con vórtice, o con el uso de un dispositivo automático para micromezcla tal como se describe, por ejemplo, por Hirota et al. (Hirota et al. 1999, *Biotechniques*, 27, 286-290) o Kasper et al. (Kasper et al. 2011, *Eur J Pharm Biopharm*, 77, 182-185) o mediante el enfoque de microfluidos, según lo revisado por Xuan et al. (Xuan et al. 2010, *Microfluidics and Nanofluidics*, 9, 1-16).

30 Para incorporar componentes adicionales, además del ácido nucleico y el oligómero, polímero, lípido o lipidoide para ser incorporados en las partículas de la formulación de partículas, se puede usar la mezcla secuencial. En este caso, puede añadirse cualquier componente adicional después del autoensamblaje del oligómero, polímero, lípido o lipidoide y el ácido nucleico, o puede añadirse a cualquiera de estos antes de mezclar.

35 Por ejemplo, la formación de poliplexos puede lograrse convenientemente al mezclar una solución que contiene el ácido nucleico en agua y una solución que contiene el polímero u oligómero catiónico en agua.

También para la formación de liposomas, se encuentran disponibles técnicas establecidas. Incluyen, por ejemplo, la rehidratación de lípidos o componentes de lípidos, tales como lípidos o películas de lípidos, seguida de técnicas de homogeneización como, por ejemplo, ultrasonidos o extrusión, cuando sea necesario. Los enfoques alternativos son la infusión de lípidos o de componentes lipídicos disueltos en disolventes orgánicos, en agua o una solución acuosa.

- 5 Como un ejemplar del procedimiento, en el que se puede confiar la formación de nanopartículas lipídicas o lipoplejos, se puede mencionar el procedimiento de desplazamiento de disolvente.

Las partículas que dependen de un vector viral pueden proporcionarse mediante procedimientos biológicos conocidos.

- 10 Como ejemplos adicionales para la preparación de una formulación de partículas, las partículas que comprenden un agente terapéuticamente activo se pueden formar mediante la emulsión de una solución que contiene el agente activo, opcionalmente en combinación con un agente formador de matriz, seguido de la solidificación de las partículas. La solidificación se puede lograr, por ejemplo, al eliminar un disolvente de una fase oleosa emulsionada en la que está contenido un material formador de matriz, o al reticular o polimerizar componentes para la formación de una matriz. También los materiales y procedimientos para la formación de formulaciones liposomales son conocidos por el facultativo experto.

- 15 El aditivo crioprotector se puede añadir convenientemente a la fase líquida en la que se suspende la formulación de nano o micropartículas o en la que se va a proporcionar la suspensión. En otras palabras, la adición del aditivo crioprotector a la fase líquida se puede realizar antes, durante o después de proporcionar la formulación de partículas suspendida en la fase líquida.

- 20 Una composición sólida adecuada para almacenar la composición para uso de acuerdo con la presente invención puede prepararse mediante un proceso, que comprende:

una primera etapa para preparar una composición según lo descrito con anterioridad por un proceso que comprende

- a) proporcionar una formulación de nano o micropartículas de un ácido nucleico como un agente terapéuticamente activo que está suspendida en una fase líquida, y
- 25 b) añadir al menos un aditivo crioprotector seleccionado de alcanos C3-C5 sustituidos por uno o dos grupos hidroxilo a la fase líquida, en el que la adición del aditivo crioprotector a la fase líquida se puede lograr antes, durante o después de proporcionar la formulación de partículas suspendida en la fase líquida, y una segunda etapa de congelación de la composición obtenida en la primera etapa.

Con respecto a la primera etapa, se entenderá que la información que se proporciona anteriormente con respecto a la preparación de la composición en suspensión se aplica igualmente para la preparación de la composición sólida.

- 30 La etapa de congelación como segunda etapa se logra típicamente sometiendo la composición en suspensión a temperaturas suficientemente frías (por ejemplo, -10 °C o menos, preferentemente -20 °C o menos) en un recipiente adecuado. Como medio refrigerante, se puede usar, por ejemplo, aire frío o líquidos fríos.

- 35 De hecho, como ya se ha explicado, la composición sólida es una composición que permite almacenar una formulación en partículas de un agente terapéuticamente activo que contiene nanopartículas o micropartículas. En ese sentido, se comprenderá que una composición en suspensión para uso de acuerdo con la invención también puede recuperarse de la composición sólida por la descongelación de la composición sólida.

Por lo tanto, una composición para su uso de acuerdo con la invención también puede prepararse mediante un proceso que comprende:

una primera etapa para preparar una composición según lo descrito con anterioridad por un proceso que comprende

- 40 a) proporcionar una formulación de nano o micropartículas de un ácido nucleico como un agente terapéuticamente activo que está suspendida en una fase líquida, y
- b) añadir al menos un aditivo crioprotector seleccionado de alcanos C3-C5 sustituidos por uno o dos grupos hidroxilo a la fase líquida, en el que la adición del aditivo crioprotector a la fase líquida se puede lograr antes, durante o después de proporcionar la formulación de partículas suspendida en la fase líquida, una segunda etapa de congelación de la
- 45 composición obtenida en la primera etapa, y una tercera etapa de descongelación de la composición congelada obtenida en la segunda etapa.

Procedimientos y usos

La composición para su uso de acuerdo con la invención, es decir, una composición que comprende

- 50 (i) una formulación de nano o micropartículas de un agente terapéuticamente activo que está suspendida en una fase líquida, y

(ii) al menos un aditivo crioprotector seleccionado de alcanos C3-C5 sustituidos por uno o dos grupos hidroxilo, puede conservarse por la congelación de la composición.

5 Continúa aplicando la información proporcionada anteriormente con respecto a las realizaciones adecuadas y preferentes del agente terapéutico, de su formulación de partículas, del aditivo crioprotector, en la fase líquida, en los procedimientos disponibles para proporcionar la composición, y en la etapa de congelación.

10 Como entenderá el lector experto, el término "conservación" indica en este contexto que las características terapéuticas relevantes de la formulación de partículas del agente terapéuticamente activo se retienen en un grado sustancial, preferentemente completamente retenidas, durante su almacenamiento. El procedimiento de conservación de la formulación de partículas implica típicamente, además, el almacenamiento de la composición congelada mientras se retiene en su estado congelado durante un período de tiempo deseado, por ejemplo, durante varias horas, días, semanas, meses o incluso años.

Ejemplos

Abreviaturas

Abreviatura	Descripción
TA	Temperatura ambiente
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
brPEI	Polietilenimina ramificada
FLuc	Luciferasa de luciérnaga
sin	sin
ARNqm	ácido ribonucleico químicamente modificado
FLuc	Luciferasa de luciérnaga
PG	1,2-propanodiol, propileno glicol
N/P	Relación de nitrógeno amínico portador a fosfato de ARNm

15 Ejemplo I: Cribado de diferentes clases de moléculas como aditivos crioprotectores para formulaciones de nano o micropartículas.

Formación del complejo

20 Se formaron complejos de poli(etilenimina) ramificada (brPEI) y ARNm que codifica la luciferasa, a una concentración final de 0,25 mg/ml. En un procedimiento de mezcla estándar, el ARNm se diluyó con agua hasta una concentración de 0,5 mg/ml. Se preparó el mismo volumen de solución de brPEI a una concentración de 0,65 mg/ml en agua. Se formaron nanopartículas o micropartículas mediante la inyección de la solución de ARNm en la solución de brPEI, seguido de su mezcla con el uso de una pipeta electrónica (Mettler-Toledo, E4 LTS 1.000 µL). Después de mezclar, los complejos se incubaron durante 20 minutos en hielo antes de su uso.

Mediciones de tamaño

25 Para la determinación del diámetro de las partículas, se llenaron 100 µL de una suspensión de las partículas en una cubeta (Brand, UV-cuvette Micro) y se midieron usando un Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments), lo que da los diámetros hidrodinámicos y el diámetro hidrodinámico promedio (promedio z) en nm. Como medio de suspensión, se usó agua o agua que contiene un aditivo crioprotector, como se indica.

Desafío de congelación-descongelación

30 La formulación se diluyó 1:2 con soluciones de aditivo 2X (20/10/2 %) (Tabla 1), y se dividió por duplicado. Se usó una muestra de cada formulación resultante para la determinación del tamaño (Malvern Zetasizer NanoZS) en presencia de aditivo. Las muestras restantes se congelaron a -20 °C durante 16 h, se descongelaron a TA y se almacenaron inmediatamente en hielo antes de que las soluciones alcanzaran TA.

35 Luego, cada formulación descongelada se usó para la determinación del tamaño (Malvern Zetasizer NanoZS) y se comparó con respecto al % de desviación de tamaño de las formulaciones antes de congelar y después de descongelar, de acuerdo con la siguiente ecuación, en la que d_h indica el diámetro promedio de partículas z:

$$\text{desviación de tamaño [\%]} = \left(\frac{d_h (\text{después de congelación})}{d_h (\text{antes de congelación})} - 1 \right) * 100 \%$$

Ensayo de transfección y de actividad de la luciferasa

Las células A549 se cultivaron en medio MEM suplementado con suero fetal bovino (FBS) al 10 %, y 1 % de estreptomycin/penicilina a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células se sembraron a 20.000 células/pocillo en 100 µl de medio, en una placa de 96 pocillos, 24 h antes de la transfección. El día de la transfección, el medio se reemplazó con MEM sin FBS y penicilina/estreptomycin seguido de la adición de ARNm acomplejado, 60 µl/pocillo, por duplicado. 4 h después de la transfección, el medio se reemplazó con MEM con FBS al 10 % y P/S al 1 %. Las placas se incubaron durante 24 h a 37 °C y 5 % de CO₂. Después de 24 h de incubación, se retiró el medio y las células se lisaron en 100 µl de tampón de lisis (Tris HCl 25 mM, TritonX-100 al 0,1 %, pH 7,8) y se incubaron en un agitador de placas durante 30 min a 600 rpm. A continuación, se transfirieron 50 µl del lisado de células de cada pocillo a una placa de 96 pocillos, y se midió la actividad de luciferasa de luciérnaga indicadora mediante la intensidad de bioluminiscencia en un Tecan Infinite 200 PRO, después de la adición de tampón de luciferina (D-luciferina 0,47 mM, Coenzima A 0,27 mM, DTT 3,33 mM, ATP 0,53 mM, MgCO₃ 1,1 mM, MgSO₄ 2,7 mM, Tricina 20 mM, EDTA 0,1 mM).

Preparación de muestras para los experimentos in vivo

Los complejos se prepararon como se describe en "formación de complejos" y "desafío de congelación-descongelación" con la siguiente modificación. Se prepararon 4 ml de solución compleja a una concentración de ARNm de 0,5 mg/ml y se diluyeron 1:2 con una solución de aditivo doblemente concentrado para dar como resultado una concentración final de ARNm de 0,25 mg/ml (8 ml). Las muestras se mantuvieron congeladas hasta su nebulización a los animales.

Nebulización

Los animales se colocaron en una cámara de dosificación en masa de tamaño pequeño Buxco (Data Sciences International, Alemania). Las formulaciones se descongelaron a temperatura ambiente, se colocaron en hielo triturado antes de alcanzar la temperatura ambiente y luego se nebulizaron usando un nebulizador Aeroneb Solo (Aeroneb, Alemania), a una velocidad de circulación de aire de 3 L/min y un ciclo de trabajo del 100 %.

Medición de bioluminiscencia en pulmones explantados

24 h después de la aplicación, los animales se colocaron bajo anestesia completa mediante inyección intraperitoneal de Fentanilo/Midazolam/Medetomidina (0,05/5,0/0,5 mg/kg de peso corporal). Se aplicaron 50 µL de D-Luciferina (30 mg/ml disueltos en solución salina tamponada con fosfato, pH 7) a través de la vía de inhalación (inhalación de la solución después de que se aplicó directamente en las fosas nasales) y se aplicaron 100 µL de D-Luciferina sistémicamente mediante inyección intraperitoneal. 10 minutos después de la administración de la luciferina, los ratones se sacrificaron a través de dislocación cervical. Después de la perfusión con PBS a través del corazón derecho, se explantaron los pulmones. La bioluminiscencia se midió usando un Xenogen MS Luminar XR (Caliper LifeSciences) con un binning fijado en 8 y un tiempo de exposición de 5 min. La bioluminiscencia se cuantificó y analizó con el uso del Living Image Software 4.4 (Xenogen). En el caso de imágenes sobresaturadas (detección de expresión fuera del intervalo lineal), el tiempo de exposición se redujo a 1 min. La bioluminiscencia se midió como el flujo total de órganos (en fotones/seg). Para el análisis solo se usaron imágenes sin sobresaturación. Los pulmones se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80 °C.

Actividad de la luciferasa en pulmones homogeneizados

Se pesaron los órganos descongelados y la mitad de los pulmones explantados se homogeneizó en tampón de lisis usando un homogeneizador FastPrep -24 (MP Biomedicals). El luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold Technologies) añadió automáticamente 100 µL de tampón de luciferina a 75 µL de lisados centrifugados. La actividad de la luciferasa se midió en RLU/s y se convirtió en RLU/órgano.

Resultados

Se demostró la capacidad de prevenir la agregación de partículas de formulaciones de polímero/ARNm después de un ciclo de congelación-descongelación para diferentes tipos de aditivos, incluyendo los compuestos establecidos como aditivos crioprotectores en la técnica. La composición que usa 1,2-propanodiol es una composición de acuerdo con la invención, las otras composiciones son composiciones de referencia. Se evaluaron los diámetros de partículas hidrodinámicas antes de la congelación. Después de 16 h a -20 °C, se descongelaron las formulaciones y se midió nuevamente el diámetro de partícula hidrodinámico. Las diferencias de tamaño entre las partículas antes de la congelación y después de la descongelación se muestran en la Tabla 1b. Los números altos indican un gran aumento de tamaño y, por lo tanto, de agregación.

Tabla 1a: Tamaño estándar de un complejo recién preparado en agua medido con el ZetaSizer Nano ZS (Malvern)

Vehículo	Diámetro hidrodinámico (promedio z [nm])
brPEI, N/P 10	122,6

Tabla 1b: Desviación del tamaño de partícula después de un ciclo de congelación-descongelación en comparación con complejos frescos en diferentes tipos y concentraciones de aditivos.

5 Prueba de congelación-descongelación (-20 °C) de formulaciones de brPEI 25kDa/ARNm N/P 10 a una concentración de ARNm de 0,25 mg/ml que contienen el % (p/v) indicado de aditivo. La α -lactosa monohidrato y el D-Manitol se probaron a concentraciones reducidas debido a su limitada solubilidad en agua. El cloruro de sodio se probó a concentraciones reducidas para permanecer dentro del intervalo de concentración isotónica. n = 1.

Clase	Aditivo	Concentración del aditivo [% p/v]	Diferencia de tamaño [%]
n/a	sin	0	1121
Disacáridos	D-(+)-Trehalosa Dihidratada*	10	-6
		5	3
		1	659
	Sacarosa*	10	-10
		5	0
		1	1608
	monohidrato de α -Lactosa*	2,5	14
		1	17
		0,25	1059
Oligosacáridos	Dextrano de Leconostoc spp.*	10	-48
		5	52
		1	469
	(2-Hidroxipropil)- β -ciclo-dextrina*	10	12
		5	30
		1	135
Alcoholes	Glicerol*	10	2
		5	-5
		1	836
	1,2-Propanodiol	10	3
		5	10
		1	28
	D-Manitol*	2,5	45
		1	210
		0,25	947
Polímeros	Polivinilpirrolidona*	10	-35
		5	2
		1	190
	PEG nominal Mp 5k*	10	211
		5	356
		1	724
	PEG nominal Mp 4k*	10	75
		5	230
		1	980
	PEG nominal Mp 10k*	10	40
		5	86
		1	1234
	PEG nominal Mp 20k*	10	300
		5	464
		1	1677
Tween® 20*	10	13	

ES 2 960 939 T3

	Tween® 80*	5	35
		1	842
		10	32
		5	18
		1	192
Sal	Cloruro de sodio*	1,35	1451
		0,9	4194
		0,45	1709

*composición de referencia

Tabla 2: Relaciones en peso en el experimento anterior de ARNm/polímero/1,2-propanodiol.

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

- 5 Un aumento del tamaño de más del 100 % (100% diámetro doble) se definió como proceso de agregación. Los aditivos que resultan en una diferencia de tamaño por debajo de este umbral se seleccionaron para probarse *in vitro*, para la eficiencia de transfección en células A549 después de un ciclo de congelación-descongelación (Figura 1 y Tabla 3). Los azúcares no se probaron *in vitro*.

10 La Figura 1 muestra la eficiencia de la transfección en células A549 de las formulaciones de brPEI/FLuc ARNm N/P 10 que contienen aditivos.

Tabla 3: Datos tabulados de la Figura 1.

		Dosis [μ g ARNm/pocillo]			
Aditivo		0,125	0,25	0,5	
Tipo	Conc. p/v	RLU [cps]			
brPEI 25 kDa/Fluc, N/P10	complejo fresco*	0	11 \pm 0,5	76 \pm 29,5	698 \pm 364,5
	Polisorbato-80*	5	10 \pm 2,5	85 \pm 16,5	875 \pm 405,5
	Polivinilpirrolidona*	5	14 \pm 1,5	60 \pm 24,0	336 \pm 121,0
	PEG nominal Mp 4k*	10	17 \pm 1,0	58 \pm 5,5	365 \pm 69,5
	(2-Hidroxipropil)- β -ciclo-dextrina*	5	11 \pm 3,5	44 \pm 9,5	332 \pm 12,5
	Glicerol*	5	17 \pm 2,0	31 \pm 6,0	204 \pm 64,0
	PEG nominal Mp 10k*	10	9 \pm 3,0	19 \pm 8,0	205 \pm 33,0
	D-Manitol*	5	20 \pm 7,5	22 \pm 9,0	179 \pm 5,5
	1,2-Propanodiol	5	8 \pm 6,5	15 \pm 3,5	176 \pm 3,5

*composición de referencia

- 15 A partir de los datos tabulados, se puede ver que todos los aditivos retuvieron la eficiencia de transfección y, por lo tanto, se seleccionaron para probarlos mediante nebulización en ratones. Se nebulizaron 8 ml de solución compleja que contenía 2 mg de ARNm que codifica la luciferasa de luciérnaga en un grupo de ratones BALB/c (n = 3). 24 h después del tratamiento, los ratones se sacrificaron. Se analizó la eficiencia de la entrega del ARNm a través de la

cuantificación de la actividad de la luciferasa en el órgano extirpado (por lvis), así como en el homogeneizado de órganos (ver Figura 2 y Tabla 4). Las relaciones en peso de ARNm/polímero/1,2-propanodiol empleadas se indican en la Tabla 5.

5 La Figura 2 muestra la eficiencia de la transfección *in vivo* de las formulaciones de brPEI/ARNm aplicadas a través de nebulización después de un ciclo de congelación-descongelación.

Se nebulizaron a ratones con 2 mg de ARNm de FLuc complejado con brPEI 25 kDa a N/P 10 y 0,25 mg/ml, después de un ciclo de congelación-descongelación, en presencia de los aditivos indicados. Como referencia, un grupo se trató con partículas recién preparadas sin la adición de aditivos. La alta viscosidad de las formulaciones que contienen 10 % de PEG4k o 10k impidió la nebulización por el nebulizador Aeroneb, n = 3.

10 Tabla 4: Los datos tabulados de la Figura 2 incluyen datos de bioluminiscencia.

Aditivo		Bioluminiscencia (pulmones explantados)		Actividad de luciferasa (homogeneizados)	
Tipo	Conc. [% p/v]	Flujo total [fotones/seg]	STDEV	[RLU/órgano]	STDEV
sin (complejo fresco)*	0	113600	90026	11745	5284
1,2-Propanodiol	5	134100	65699	11168	5372
(2-Hidroxipropil)-β-ciclo-dextrina*	5	20110	9911	2347	1292
D-Manitol*	5	11760	4135	977	453
Polisorbato-80*	5	16117	11444	1075	919
Glicerol*	5	7610	624	719	80
Polivinilpirrolidona*	5	7463	2292	369	180
PEG nominal Mp 4k*	10	no nebulizable			
PEG nominal Mp 10k*	10	no nebulizable			
Trehalosa*	5	10140	3675	978	172
Sacarosa*	5	8922	838	716	78
Lactosa*	5	5792	1770	338	46

*composición de referencia

Tabla 5: Relaciones en peso en el experimento anterior de ARNm/polímero/1,2-propanodiol.

1,2-Propanodiol % p/v	ARNm [mg]	Polímero [mg]	1,2-Propanodiol [mg]
5	1	1,3	208,0

15 *Discusión y Conclusión*

El 1,2-propanodiol (propilen glicol, PG) se ha identificado como un aditivo que previene la agregación de partículas y mantiene la eficiencia de transfección de las formulaciones después de la nebulización *in vivo*, después de un ciclo de congelación-descongelación, en comparación con nanopartículas o micropartículas de brPEI/ARNm recién formuladas.

Ejemplo II: Comparación de diferentes aditivos relacionados estructuralmente con el 1,2-propanodiol como crioprotectores para nanopartículas o micropartículas.

Formación del complejo

5 Se formaron complejos de poli(etilenimina) ramificada (brPEI) y ARNm que codifica la luciferasa, a una concentración final de 0,25 mg/ml. En un procedimiento de mezcla estándar, el ARNm se diluyó con agua hasta una concentración de 0,5 mg/ml. Se preparó el mismo volumen de solución de brPEI a una concentración de 0,65 mg/ml en agua. Las nanopartículas se formaron mediante la inyección de la solución de ARNm en la solución de brPEI, seguido de su mezcla con el uso de una pipeta electrónica (Mettler-Toledo, E4 LTS 1000 µL). Después de mezclar, los complejos se incubaron durante 20 minutos en hielo antes de su uso.

10 *Mediciones de tamaño*

Para la determinación del diámetro de las partículas, se llenaron 100 µL de una suspensión de las partículas en una cubeta (Brand, UV-cuvette Micro) y se midieron usando un Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments), lo que da los diámetros hidrodinámicos y el diámetro hidrodinámico promedio (promedio z) en nm. Como medio de suspensión, se usó agua o agua que contiene un aditivo crioprotector, como se indica.

15 *Desafío de congelación-descongelación*

La formulación se diluyó 1:2 con soluciones de aditivo 2X (20/10/2 %) (Tabla 6) y se dividió por duplicado. Como la solubilidad de algunos aditivos era limitada, se probaron las siguientes sustancias a concentraciones reducidas (ver la Tabla 6): 2-metil-1,4-butanodiol, pentaeritritol. Se usaron muestras de cada formulación resultante para la determinación del tamaño (Malvern Zetasizer NanoZS) en presencia del aditivo. Las muestras restantes se congelaron a -20 °C durante 16 h, se descongelaron a TA y se almacenaron inmediatamente en hielo antes de que las soluciones alcanzaran TA. Luego se usó una muestra de cada formulación descongelada para la determinación del tamaño (Malvern Zetasizer NanoZS) y se comparó con respecto al % de desviación de tamaño de las formulaciones, antes de congelar y después de descongelar, de acuerdo con la siguiente ecuación, en la que d_n indica el diámetro promedio de partículas z:

25

$$\text{desviación de tamaño [\%]} = \left(\frac{d_n (\text{después de congelación})}{d_n (\text{antes de congelación})} - 1 \right) * 100 \%$$

Preparación de muestras para los experimentos in vivo

30 Los complejos se prepararon como se describe en "formación de complejos" y "desafío de congelación-descongelación" con la siguiente modificación. Se prepararon 4 ml de solución compleja a una concentración de 0,5 mg/ml y se diluyeron 1:2 con una solución del aditivo de doble concentración para dar como resultado una concentración final de ARNm de 0,25 mg/ml (8 ml). Las muestras se mantuvieron congeladas hasta su nebulización a los animales.

Nebulización

35 Los animales se colocaron en una cámara de dosificación en masa de tamaño pequeño Buxco (Data Sciences International, Alemania). Las formulaciones se descongelaron a temperatura ambiente, se colocaron en hielo triturado antes de alcanzar la temperatura ambiente y luego se nebulizaron usando un nebulizador Aeroneb Solo (Aeroneb, Alemania), a una velocidad de circulación de aire de 3 L/min y un ciclo de trabajo del 100 %.

Medición de bioluminiscencia en pulmones explantados

40 24 h después de la aplicación, los animales se colocaron bajo anestesia completa mediante inyección intraperitoneal de Fentanilo/Midazolam/Medetomidina (0,05/5,0/0,5 mg/kg de peso corporal). Se aplicaron 50 µL de D-Luciferina (30 mg/ml disueltos en solución salina tamponada con fosfato, pH 7) a través de la vía de inhalación (inhalación de la solución después de que se aplicó directamente en las fosas nasales) y se aplicaron 100 µL de D-Luciferina sistémicamente mediante inyección intraperitoneal. 10 minutos después de la administración de la luciferina, los ratones se sacrificaron a través de dislocación cervical. Después de la perfusión con PBS a través del corazón derecho, se explantaron los pulmones. La bioluminiscencia se midió usando un Xenogen IVIS Luminar XR (Caliper LifeSciences) con un binning fijado en 8 y un tiempo de exposición de 5 min. La bioluminiscencia se cuantificó y analizó con el uso del Living Image Software 4.4 (Xenogen). En el caso de imágenes sobresaturadas (detección de expresión fuera del intervalo lineal), el tiempo de exposición se redujo a 1 min. La bioluminiscencia se midió como flujo total por órgano (en fotones/seg). Para el análisis solo se usaron imágenes sin sobresaturación. Los pulmones se congelaron

45

rápidamente y se almacenaron a -80 °C.

Actividad de la luciferasa en pulmones homogeneizados

5 Se pesaron los órganos y se homogeneizó la mitad de los pulmones explantados en tampón de lisis, con el uso de un homogeneizador FastPrep ° -24 (MP Biomedicals). El luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold Technologies) añadió automáticamente 100 µL de tampón de luciferina a 75 µL de lisados centrifugados. La actividad de la luciferasa se midió en RLU/s y se convirtió en RLU/órgano.

Resultados

10 El ejemplo I muestra que el 1,2-propanodiol previene la agregación de nano o micropartículas durante la congelación, mientras se mantiene la actividad *in vivo*, mientras que el glicerol (una molécula con similitud química) evita la agregación durante la congelación sin mantener la actividad *in vivo*. Los resultados de esta prueba muestran que los alcanoles y alcanodiolos C3-C5 relacionados estructuralmente con el 1,2-propanodiol pueden prevenir la agregación durante una prueba de congelación-descongelación y mantener la eficiencia de la transfección después de la nebulización posterior. Se formaron complejos y se mezclaron con las soluciones de aditivo (en agua) para dar como resultado las concentraciones finales de aditivo enumeradas en la Tabla 6.

15 El diámetro hidrodinámico de las partículas se midió antes de congelar a -20 °C. Después de 16 h, se descongelaron todas las formulaciones y se midió de nuevo el tamaño de partícula. El % de desviación del tamaño antes de congelar frente a después de descongelar se muestran en la Tabla 6b. Los números altos indican un gran aumento de tamaño y, por lo tanto, agregación.

20 Tabla 6A: Tamaño estándar de un complejo recién preparado en agua. Medición por triplicado con ZetaSizer Nano ZS (Malvern)

Vehículo	Diámetro hidrodinámico (promedio z [nm])	Pdl
brPEI, N/P 10	70,94	0,204
	66,30	0,193
	65,40	0,191

Tabla 6b: % de desviación del tamaño antes de la congelación versus después de la descongelación de las concentraciones de aditivo probadas.

25 El 2-metil-1,4-butanodiol y el Pentaeritritol se probaron a concentraciones reducidas, debido a su limitada solubilidad en agua, n = 1.

Formulación	Aditivo	Concentración del aditivo [% p/v]	Diferencia de tamaño [%]
brPEI/ARNm N/P10 0,25 mg/ml	no*	0	1115
		0	1766
		0	945
	2-Propanol	10	47
		5	60
		1	120
	1,2-Propanodiol	10	1
		5	7
		1	38
	1,2-Butanodiol	10	0
		5	11
		1	50
	1,3-Butanodiol	10	1
		5	16
		1	41
2-metil-1,4-butanodiol	1,25	33	
	0,625	77	

	0,125	1285
1,1,1-Tris(hidroximetil)etano*	10	510
	5	353
	1	690
Pentaeritritol*	5	316
	2,5	323
	0,5	609
1,1,1-Tris (hidroximetil)propano*	10	1
	5	13
	1	41
Tetraglicol*	10	17
	5	34
	1	90
Glicerol formal*	10	13
	5	17
	1	67
Trietilen glicol*	10	3
	5	20
	1	32
Glicerol*	10	12
	5	8
	1	46

*ejemplos de referencia

Un cambio en el tamaño de partícula de más del 100 % (100 % = diámetro doble) se definió como un proceso de agregación. Los aditivos que resultan en una desviación de tamaño porcentual por debajo de este umbral se seleccionaron para probarlos mediante nebulización en ratones (Figura 3 y Tabla 7).

- 5 La Figura 3 muestra la eficiencia de transfección *en vivo* de formulaciones de brPEI/ARNm después de un ciclo de congelación-descongelación.

Se nebulizaron a ratones con 2 mg/8 ml de ARNm de FLuc complejo con brPEI 25 kDa a N/P 10 y 0,25 mg/ml después de un ciclo de congelación-descongelación en presencia de los aditivos indicados. 24 h después del tratamiento, se anestesiaron los ratones, se explantaron los pulmones, se homogeneizaron y se midió la actividad luciferasa. n = 3.

10

Tabla 7: Los datos tabulados de la Figura 3 incluyen datos de bioluminiscencia.

Aditivo		Bioluminiscencia (pulmones explantados)		Actividad de la luciferasa (homogeneizados)	
Tipo	Conc. [mg/ml]	Flujo total [fotones/seg]	STDEV	[RLU/órgano]	STDEV
sin (complejo fresco)*	0	113600	90026	11745	5284
1,2-Propanodiol	5	168833	87083	22457	9895
2-Propanol	10	208173	93362	17680	3807
1,2-Butanodiol	5	77080	27417	9475	5724
1,3-Butanodiol	5	65000	39251	7508	2858
2-metil-1,4-butanodiol	0,625	58187	21887	5465	2697
Glicerol formal*	5	19097	14362	1137	1040
Tetraglicol*	5	10407	880	267	112
1,1,1-Tris (hidroximetil)propano*	5	38467	30234	266	163

Trietilen glicol*	5	17833	3734	245	102
-------------------	---	-------	------	-----	-----

*ejemplos de referencia

Discusión y Conclusión

5 Dentro de este estudio, se pudo demostrar que los alcanoles/alcanodiolos relacionados estructuralmente con el 1,2-propanodiol tienen la capacidad de mantener la eficiencia de la transfección del complejo después de la nebulización a los pulmones murinos, después de un ciclo de congelación-descongelación. Las propiedades biofísicas se analizaron primero antes de la congelación y después de un ciclo de congelación-descongelación, ya que la agregación o la rotura de partículas conducen a formulaciones no funcionales. Los hallazgos del ejemplo I podrían replicarse ya que el 1,2-propanodiol y el glicerol preservan el tamaño de partícula. Como ya se demostró en el estudio anterior, la preservación del tamaño de partícula no resultó automáticamente en partículas funcionales después de la nebulización en ratones.

10 **Ejemplo III: Congelación de formulaciones a concentraciones variables de ARNm y/o relaciones N/P variables.**

Formación del complejo

15 Complejos de (polietilenimina) ramificada (brPEI), P7 (lineal (polietilenimina-co-propilenimina), PM: 20 kDa) o P12 lineal (polietilenimina-co-propilenimina), PM: 24 kDa) con ARNm que codifica luciferasa se formaron a una concentración de 0,25 mg/ml. En un procedimiento de mezcla estándar, el ARNm se diluyó a una concentración de 0,5 mg/ml en agua. Se preparó el mismo volumen de la solución del polímero a una concentración de 0,65 mg/ml en agua. Para formular las nanopartículas, se inyectó la solución de ARNm en la solución de brPEI, seguido de mezclarlos con el uso de una pipeta electrónica (Mettler-Toledo, E4 LTS 1000 µL). Después de mezclar, los complejos se incubaron durante 20 min en hielo antes de su uso.

Concentración de las formulaciones

20 Antes de su uso, la membrana de una unidad de filtro de centrifugación Amicon® Ultra-15 (Merck Millipore, membrana PLHK Ultracel-PL, límite de peso molecular de 100 kDa) se lavó con 15 ml de agua (500 × g). Luego, la formulación de poliplex se transfirió a la unidad de filtrado y se centrifugó a 500 × g y 4 °C. En un intervalo de 5 min., se verificó el nivel de líquido para evitar la sobreconcentración y la solución se mezcló completamente con una pipeta de 1 ml. En cada intervalo, se controló la concentración de la muestra mediante evaluación espectrofotométrica de la concentración de ácido nucleico (A₂₆₀). Este proceso se repitió hasta alcanzar la concentración deseada.

Mediciones de tamaño

30 Para la determinación del diámetro de las partículas, se llenaron 200 µL de una suspensión de las partículas en una cubeta (Brand, UV-cuvette Micro) y se midieron usando un Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments), lo que da los diámetros hidrodinámicos y el diámetro hidrodinámico promedio (promedio z) en nm. Como medio de suspensión, se usó agua o agua que contiene un aditivo crioprotector, como se indica.

Desafío de congelación-descongelación

35 Después de una determinación inicial del tamaño del poliplex (Malvern Zetasizer NanoZS), la formulación se distribuye en placas de PCR de bajo perfil de 96 pocillos (transparente, libre de ARNasa y ADNasa) y se diluye 1:2 con soluciones de aditivo 2X (20/10/2%) (Tabla 1). Se usó una muestra de cada formulación resultante para la determinación del tamaño (Malvern Zetasizer NanoZS). Las muestras restantes se congelaron a -20 °C durante ~ 16 h, se descongelaron a TA y se almacenaron inmediatamente en hielo antes de que las soluciones alcanzaran TA. Luego se usó una muestra de cada formulación descongelada para la determinación del tamaño (Malvern Zetasizer NanoZS) y se comparó con respecto al % de desviación de tamaño de las formulaciones, antes de congelar y después de descongelar, de acuerdo con la siguiente ecuación, en la que d_h indica el diámetro promedio de partículas z:

$$\text{desviación de tamaño [\%]} = \left(\frac{d_h \text{ (después de congelación)}}{d_h \text{ (antes de congelación)}} - 1 \right) * 100 \%$$

40

Resultados

45 En este experimento se pudo demostrar la capacidad de la clase reivindicada de las moléculas identificadas para actuar como crioprotector para nanopartículas o micropartículas, también a una mayor concentración de ARNm y/o una relación N/P reducida. Para ello, se eligió el 1,2-propanodiol como aditivo representativo. La Tabla 8 muestra el % de desviación del tamaño de partícula antes de la congelación frente a después de la descongelación de complejos congelados a diferentes concentraciones de ARNm (0,25, 1,1 o 2,3 mg/mL) y diferentes relaciones N/P (N/P 4 o 10). Las relaciones en peso de ARNm/polímero/1,2-propanodiol empleadas se indican en la Tabla 9.

Tabla 8: % de desviación de tamaño antes de la congelación versus después de la descongelación, n = 3.

Relación N/P	Conc. de ARNm [mg/ml]	de 1,2-Propanodiol			[% p/v]		
		10			5		
4	0,25	-2	-1	4	12	15	17
4	1,1	5	15	6	25	29	20
10	2,3	20	20	21	17	22	22

Los datos muestran que todas las condiciones probadas condujeron a evitar la agregación al usar el aditivo.

Tabla 9: Relaciones en peso en el experimento anterior de ARNm/polímero/1,2-propanodiol.

5

Relación N/P	Conc. de ARNm [mg/ml]	% en peso de 1,2-Propanodiol	ARNm [mg]	Polímero [mg]	1,2-Propanodiol [mg]
4	0,25	10	1	0,52	416,00
4	0,25	5	1	0,52	208,00
4	1,1	10	1	0,52	94,55
4	1,1	5	1	0,52	47,27
10	2,3	10	1	1,30	45,22
10	2,3	5	1	1,30	22,61

Discusión y Conclusión

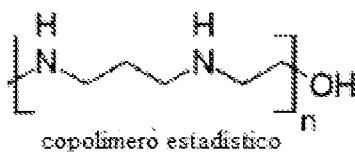
El Ejemplo III demuestra que el tamaño de partícula se puede mantener independientemente de la relación de polímero a ARNm, así como de la concentración de ARNm durante la congelación.

10 **Ejemplo IV: Carácter crioprotector de aditivos identificados para diferentes policationes (adición antes de mezclar)**

Formación del complejo

Se formaron complejos de polímero catiónico y de ARNm que codifica la luciferasa mediante el uso de tres estructuras poliméricas diferentes: poli(etilenimina) ramificada (brPEI, 25 kDa), poli(etilenimina-propilenimina) lineal (P7, 20 kDa) o poli(etilenimina-propilenimina) lineal. (P12, 24 kDa).

15 P7 y P12 son polímeros lineales de poli(etilenimina-propilenimina) de la siguiente estructura:



Síntesis:

20 Se combinó una mezcla de 2-etil-2-oxazolona seca y 2-etil-2-oxazina seca con triflato de metilo en acetonitrilo. La polimerización se llevó a cabo durante 30 h a 130 °C bajo atmósfera de nitrógeno. La polimerización se detuvo mediante la adición de agua e incubación durante 3 h a 130 °C. El polímero se obtuvo mediante tres etapas de precipitación en éter dietílico frío. Para la hidrólisis, el polímero se disolvió en ácido clorhídrico concentrado y se incubó durante 30 h a 130 °C. El pH de la solución de polímero se ajustó a pH 10 con NaOH. La purificación se realizó mediante diálisis contra agua desionizada seguida de liofilización. Mediante la modificación de la relación de 2-etil-2-oxazolona a 2-etil-2-oxazina, la relación de etilenimina (C2) a propilenimina (C3) resultante se puede modificar dentro del polímero. Con la cantidad usada de triflato de metilo se puede controlar el peso molecular.

25

Los polímeros resultantes tenían las siguientes propiedades:

Nombre del polímero	PM [g/mol]	Relación [mol:mol]	C2:C3
P7	28300	1:1	
P12	33400	1:1	

5 Los complejos se mezclaron a una concentración final de 0,25 mg/ml en las tres relaciones N/P diferentes 4, 6 y 10. En un procedimiento de mezcla estándar, el ARNm se diluyó en agua hasta una concentración de 0,5 mg/ml. Se preparó el mismo volumen de solución de polímero (ver la concentración en la Tabla 10) en agua que contiene 1,2-propanodiol al 20 % o al 10 % (p/v). Las nanopartículas se formaron mediante la inyección de la solución de ARNm en la solución de polímero, seguido de mezclarlos con el uso de una pipeta electrónica (Mettler-Toledo, E4 LTS 1.000 µL). Después de mezclar, los complejos se incubaron durante 20 minutos en hielo antes de su uso.

Tabla 10: Concentración de las soluciones de polímero para la preparación de complejos en diferentes proporciones N/P

Polímero	Concentración de la solución de polímero para la relación N/P prevista [mg/ml]		
	4	6	10
brPEI	0,26	0,39	0,65
P7	0,29	0,43	0,72
P12	0,29	0,43	0,72

10

Mediciones de tamaño

15 Para la determinación del diámetro de las partículas, se llenaron 100 µL de una suspensión de las partículas en una cubeta (Brand, UV-cuvette Micro) y se midieron usando un Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments), lo que da los diámetros hidrodinámicos y el diámetro hidrodinámico promedio (promedio z) en nm. Como medio de suspensión, se usó agua o agua que contiene un aditivo crioprotector, como se indica.

Desafío de congelación-descongelación

20 Se usó una muestra de cada formulación resultante para la determinación del tamaño (Malvern Zetasizer NanoZS). Las muestras restantes se congelaron a -20 °C durante 16 h, se descongelaron a TA y se almacenaron inmediatamente en hielo antes de que las soluciones alcanzaran TA. Luego, se usó una muestra de cada formulación descongelada para la determinación del tamaño (Malvern Zetasizer NanoZS) y se comparó con respecto al % de desviación del tamaño de las formulaciones antes de congelar y después de descongelar, de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$\text{desviación de tamaño [\%]} = \left(\frac{d_n(\text{después de congelación})}{d_n(\text{antes de congelación})} - 1 \right) * 100 \%$$

Preparación de muestras para experimentos in vivo:

25 Los complejos se prepararon como se describe en "formación de complejos" y "desafío de congelación-descongelación" a N/P 4 en un volumen de 8 ml. Las muestras se mantuvieron congeladas hasta su nebulización a los animales

Nebulización

30 Los animales se colocaron en una cámara de dosificación en masa de tamaño pequeño Buxco (Data Sciences International, Alemania). Las formulaciones se descongelaron a temperatura ambiente, se colocaron en hielo triturado antes de alcanzar la temperatura ambiente y luego se nebulizaron usando un nebulizador Aeroneb Solo (Aeroneb, Alemania), a una velocidad de circulación de aire de 3 L/min y un ciclo de trabajo del 100 %.

Medición de bioluminiscencia en pulmones explantados

35 24 h después de la aplicación, los animales se colocaron bajo anestesia completa mediante inyección intraperitoneal de Fentanilo/Midazolam/Medetomidina (0,05/5,0/0,5 mg/kg de peso corporal). Se aplicaron 50 µL de D-Luciferina (30 mg/ml disueltos en solución salina tamponada con fosfato, pH 7) a través de la vía de inhalación (inhalación de la solución después de que se aplicó directamente en las fosas nasales) y se aplicaron 100 µL de D-Luciferina sistémicamente mediante inyección intraperitoneal. 10 minutos después de la administración de la luciferina, los

5 ratones se sacrificaron a través de dislocación cervical. Después de la perfusión con PBS a través del corazón derecho, se explantaron los pulmones. La bioluminiscencia se midió usando un Xenogen MS Luminar XR (Caliper LifeSciences) con un binning fijado en 8 y un tiempo de exposición de 5 min. La bioluminiscencia se cuantificó y analizó con el uso del Living Image Software 4.4 (Xenogen). En el caso de imágenes sobresaturadas (detección de expresión fuera del intervalo lineal), el tiempo de exposición se redujo a 1 min. La bioluminiscencia se midió como flujo total por órgano (en fotones/seg). Para el análisis solo se usaron imágenes sin sobresaturación. Los pulmones se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80 °C.

Actividad de la luciferasa en pulmones homogeneizados

10 Los órganos se pesaron y la mitad de los pulmones explantados se homogeneizaron en tampón de lisis usando un homogeneizador FastPrep® -24 (MP Biomedicals). El luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold Technologies) añadió automáticamente 100 µL de tampón de luciferina a 75 µL de lisados centrifugados. La actividad de la luciferasa se midió en RLU/s y se convirtió en RLU/órgano.

Resultados

15 Los ejemplos I - III demuestran la eficiencia de los aditivos en la prevención de la agregación mientras se mantiene la eficacia *in vivo* en diferentes condiciones, únicamente con partículas formadas con poli(etilenimina) ramificada. Para demostrar que la funcionalidad de estos aditivos es independiente de las características del polímero, se probaron diferentes tipos de polímeros. El 1,2-propanodiol fue seleccionado como un aditivo ejemplar. Los polímeros se variaron en el tipo de ramificación (ramificada y lineal), peso molecular (20 kDa, 24 kDa y 25 kDa), composición de monómeros (poli(etilenimina) y poli (etilenimina-propilenimina)), así como la relación N/P (4, 6 y 10). Los polímeros elegidos ya tienen una funcionalidad probada después de la nebulización. Los resultados del % de desviación de tamaño de las partículas antes de congelar y después de descongelar, para dos concentraciones de aditivo diferentes, se muestran como desviación del tamaño en la Tabla 10. También se probó la funcionalidad de la relación N/P (N/P 4) *in vivo*. En la Figura 4 y en la Tabla 13 se ofrece un resumen de los datos de eficiencia. Las relaciones en peso de ARNm/polímero/1,2-propanodiol empleadas se indican en la Tabla 12 y la Tabla 14b.

25 Tabla 11: % Desviación de tamaño de formulaciones complejas con diferentes polímeros que contienen 5 % o 10 % (p/v) de 1,2-Propanodiol antes de la congelación versus después de la descongelación.

Concentración de ARNm [mg/ml]	Polímero	PMT [kDa]	tipo	5 % 1,2-propanodiol			10 % 1,2-Propanodiol		
				N/P 4	N/P 6	N/P 10	N/P 4	N/P 6	N/P 10
0,25	brPEI	25	ramificado	27	-22	8	12	7	1
	P7	20	lineal	31	23	37	9	3	7
	P12	24	lineal	12	0	48	48	4	2

Tabla 12: Relaciones en peso en el experimento anterior de ARNm/polímero/1,2-propanodiol.

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

Polímero	Relación N/P	1,2-Propanodiol % p/v	ARNm [mg]	Polímero [mg]	1,2-Propanodiol [mg]
P7	6	10 %	1	0,87	416
P7	10	10 %	1	1,44	416
P12	4	5 %	1	0,58	208
P12	6	5 %	1	0,87	208
P12	10	5 %	1	1,45	208
P12	4	10 %	1	0,58	416
P12	6	10 %	1	0,87	416
P12	10	10 %	1	1,45	416

La Figura 4 muestra la eficiencia de la transfección in vivo de formulaciones concentradas de polímero/ARNm.

5 Se nebulizaron a ratones con 2 mg de ARNm que codifica para luciferasa de luciémaga complejo con brPEI 25 kDa/P7/P12 a N/P 4, después de una preparación fresca (0,25 mg/ml de ARNm; 8 ml/grupo) o un ciclo de congelación-descongelación (1 mg/ml ARNm; 2 ml/grupo), en presencia de los aditivos indicados. 24 h después del tratamiento, se anestesiaron los ratones y se explantaron los pulmones. Se midió la actividad de la luciferasa en homogeneizados de pulmón, n = 3

Tabla 13: Datos tabulados de la Figura 4.

Dosis /grupo de ARNm Fluc	Polímero	Conc. de ARNm [mg/ml]	Aditivo		Bioluminiscencia (pulmones explantados)		Actividad de luciferasa (homogeneizados)	
			Tipo	Conc. [% p/v]	Flujo total [fotones/seg]	STDEV	[RLU/órgano]	STDEV
2 mg	brPEI	0,25	complejo fresco	0	64467	6809	2920	1108
	P7	0,25		0	286000	171128	27721	17186
	P12	0,25		0	202733	98217	24633	13277
	brPEI	1	1,2-Propanodiol	5	45500	24307	3152	2717
	P7	1		5	589667	274906	31606	10180
	P12	1		5	537667	367406	34458	21217
	brPEI	1		10	45967	7565	3303	1548
	P7	1		10	243000	156506	17646	12823
	P12	1		10	289000	205691	31692	30625

10 Tabla 14a: Tamaño estándar de un complejo recién preparado medido con ZetaSizer (Malvern)

Vehículo	Diámetro hidrodinámico (promedio z [nm])	Pdl
brPEI, N/P 4	158,7	0,180
P7, N/P 4	161,1	0,171
P12, N/P 4	163,5	0,177

Tabla 14b: relaciones en peso en el experimento anterior de ARNm/polímero/1,2-propanodiol.

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

Discusión y Conclusión

5 Como se muestra en este experimento, el efecto estabilizador del 1,2-propanodiol es independiente del tipo de ramificación del polímero, del peso molecular, de la composición del monómero y de la relación N/P. La variación de todos estos parámetros dio como resultado complejos intactos después de una prueba de congelación y descongelación. Además, la funcionalidad de estos complejos después de la aplicación pulmonar podría demostrarse en experimentos *in vivo*. No se pudo detectar diferencia significativa en los complejos frescos en comparación con los mismos complejos congelados en 1,2-propanodiol, al 5 % o al 10 %, con respecto a los niveles de expresión de la proteína indicadora. Las diferencias generales de la eficiencia de la poli(etilenimina) ramificada frente a poli(etilenimina-propilenimina) está en total acuerdo con la declaración del documento WO2013182683A1. Además, este experimento confirmó que el momento de la adición de aditivos no influye en su funcionalidad. Aunque se añadieron aditivos a las nanopartículas después de la complejación en los experimentos I y II, en este experimento se añadió 1,2-propanodiol a la solución de polímero antes de su mezcla con la solución de ARNm.

15 **Ejemplo V: Estabilidad de complejos congelados** (ejemplo de referencia)

Formación del complejo

Se formaron complejos de (polietilenimina) (brPEI) ramificada y ARNm que codifica la luciferasa a una concentración de 0,25 mg/ml. En un procedimiento de mezcla estándar, el ARNm se diluyó en agua hasta una concentración de 0,5 mg/ml. Se preparó el mismo volumen de solución de brPEI a una concentración de 0,65 mg/ml de agua o 10 % de 1,2-propanodiol. Para formular las nanopartículas, se inyectó la solución de ARNm en la solución de brPEI, seguido de mezclarlos con el uso de una pipeta electrónica (Mettler-Toledo, E4 LTS 1000 µL). Después de mezclar, los complejos se incubaron durante 20 min en hielo antes de su uso.

Desafío de congelación-descongelación

25 Después de una determinación inicial del tamaño del poliplex (Malvern Zetasizer NanoZS), se almacenaron triplicados de 100 µL de cada formulación, se congelaron a -20 °C durante el tiempo indicado, se descongelaron a TA y se almacenaron inmediatamente en hielo antes de que las soluciones alcanzaran la TA. Luego se usó una muestra de cada formulación descongelada para la determinación del tamaño (Malvern Zetasizer NanoZS) y se comparó con respecto al % de desviación de tamaño de las formulaciones, antes de congelar y después de descongelar, de acuerdo con la siguiente ecuación, en la que d_h indica el diámetro promedio de partículas z:

$$\text{desviación de tamaño [\%]} = \left(\frac{d_h \text{ (después de congelación)}}{d_h \text{ (antes de congelación)}} - 1 \right) * 100 \%$$

30

Medición de la integridad del ARNm

35 Las formulaciones de nanopartículas se diluyeron en agua hasta 0,2 mg/ml de ARNm. Se trataron 5 µL de esta dilución con 3 µL de 40 mg/ml de Heparina, 2 µL de Triton X-100 al 2 % v/v, y 10 µL de formamida. La mezcla se incubó durante 15 min a 70 °C para la rotura completa de las partículas y luego se mantuvo en hielo triturado. A continuación, se realizó el análisis de fragmentos de ácido nucleico mediante electroforesis en gel capilar (Advanced Analytical Fragment Analyzer, PROSize 2.0). La señal de ARNm de longitud completa de las formulaciones tratadas (ARNm_{tratado}) se comparó con el del ARNm fresco, no complejado (ARNm_{ref}), del mismo lote que se usó para la formulación como

referencia y se expresó como integridad del ARNm [%], de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{Integridad de ARNm [\%]} = \left(\frac{\text{ARNm}_{\text{tratado}}}{\text{ARNm}_{\text{ref}}} \right) * 100 \%$$

Resultados

5 Un parámetro crítico para nanopartículas o micropartículas basadas en ARNm es la estabilidad del ARNm en el complejo. Como se muestra en la Tabla 15, almacenar complejos a 25 °C da como resultado una rápida degradación del ARNm complejo. En este experimento se probó la influencia de la capacidad para congelar los complejos sobre la estabilidad del ARN complejo. En el primer grupo, se formaron complejos con ARN y se congelaron después de la adición de 1,2-propanodiol como ejemplar de candidato del grupo de aditivos de buen desempeño. La integridad del ARNm (cantidad de ARNm de longitud completa) en el complejo se probó antes de la congelación y una semana después del almacenamiento a -20 °C. Se midió el ARNm reciente no complejo y se fijó al 100 % como referencia. Los resultados se resumen en la Tabla 16.

En un segundo grupo, el experimento se repitió después de almacenar los complejos durante ocho semanas a -20 °C. Los resultados se muestran en la Tabla 17.

15 Tabla 15: Integridad del ARNm en complejos a TA.

Polímero	integridad del ARNm [%]		
	0 h	1,5 h	3 h
brPEI	10 ± 0	77,5	56,4

Tabla 16: Integridad del ARNm en complejos congelados (5 % de 1,2-propanodiol, -20 °C, 1 semanas) versus poliplexos recién preparados o ARNm fresco.

Muestra	Integridad del ARNm [%]
ARNm fresco	100
poliplex fresco	98
poliplex FT de 1 semana (triplicado)	94,7 ± 0,7

20 Tabla 17: Integridad del ARNm en complejos congelados (5 % de 1,2-propanodiol, -20 °C, 8 semanas) frente a ARNm fresco.

Muestra	Integridad del ARNm [%]
ARNm fresco	100
poliplex FT de 8 semana (triplicado)	98,9 ± 7,5

Discusión y Conclusión

25 Los experimentos descritos muestran el gran beneficio de la capacidad de congelar nanopartículas o micropartículas para su almacenamiento a largo plazo. Mientras que los complejos almacenados a temperatura ambiente conducen a un proceso de degradación del ARNm en cuestión de horas, los complejos almacenados en un estado congelado dan como resultado un ARNm completamente conservado durante al menos ocho semanas.

Ejemplo VI: 1,2-Propanodiol como crioprotector para formulaciones a base de lípidos

Formación del complejo

30 Los componentes lipídicos (lípidos catiónicos, colesterol lipídico auxiliar y PEG-lípido) se solubilizaron y se mezclaron en isopropanol, y se inyectaron en una proporción volumétrica de 1:4 en una solución de ARNm en tampón citrato

(ácido cítrico 10 mM, NaCl 150 mM, pH 4,5), dando como resultado una concentración de ARNm de 0,2 mg/ml. Los complejos se incubaron durante 20 min a TA. Después de la incubación, la solución se dializó contra agua durante 16 h. La concentración del ARNm después de la diálisis fue de 0,13 mg/ml. Para alcanzar una concentración de ARNm de 0,2 o 0,5 mg/ml, las partículas se concentraron en un SpeedVac (Concentrator Plus, Eppendorf) a 45 °C.

5 *Mediciones de tamaño*

Para la determinación del diámetro de las partículas, se llenaron 200 µL de una suspensión de las partículas en una cubeta (Brand, UV-cuvette Micro) y se midieron usando un Malvern ZetaSizer Nano ZS (Malvern Instruments), lo que da los diámetros hidrodinámicos y el diámetro hidrodinámico promedio (promedio z) en nm. Como medio de suspensión, se usó agua o agua que contiene un aditivo crioprotector, como se indica.

10 *Desafío de congelación-descongelación*

Las formulaciones se diluyeron 1:2 con 2X (20 o 10 %) soluciones de 1,2-propanodiol y se dividieron en diferentes muestras. Se usaron muestras de cada formulación resultante para la determinación del tamaño (Malvern Zetasizer NanoZS) en presencia del aditivo. Las muestras restantes se congelaron a -20 °C durante 16 h, se descongelaron a TA y se almacenaron inmediatamente en hielo antes de que las soluciones alcanzaran TA. Luego se usó una muestra de cada formulación descongelada para la determinación del tamaño (Malvern Zetasizer NanoZS) y se comparó con respecto al % de desviación de tamaño de las formulaciones, antes de congelar y después de descongelar, de acuerdo con la siguiente ecuación, en la que d_h indica el diámetro promedio de partículas z:

$$\text{desviación de tamaño [\%]} = \left(\frac{d_h \text{ (después de congelación)}}{d_h \text{ (antes de congelación)}} - 1 \right) * 100 \%$$

Aplicación de pulverización intratraqueal

20 Se aplicaron 50 µL de solución del complejo por vía intratraqueal, con el uso de un dispositivo MicroSprayer 1A (PennCentury, EE.UU.), bajo anestesia por inhalación de isoflurano.

Medición de bioluminiscencia en pulmones explantados

24 h después de la aplicación, los animales se colocaron bajo anestesia completa mediante inyección intraperitoneal de Fentanilo/Midazolam/Medetomidina (0,05/5,0/0,5 mg/kg de peso corporal). Se aplicaron 50 µL de D-Luciferina (30 mg/ml disueltos en solución salina tamponada con fosfato, pH 7) a través de la vía de inhalación (inhalación de la solución después de que se aplicó directamente en las fosas nasales) y se aplicaron 100 µL de D-Luciferina sistémicamente mediante inyección intraperitoneal. 10 minutos después de la administración de la luciferina, los ratones se sacrificaron a través de dislocación cervical. Después de la perfusión con PBS a través del corazón derecho, se explantaron los pulmones. La bioluminiscencia se midió usando un Xenogen IVIS Luminar XR (Caliper LifeSciences) con un binning fijado en 8 y un tiempo de exposición de 5 min. La bioluminiscencia se cuantificó y analizó con el uso del Living Image Software 4.4 (Xenogen). En el caso de imágenes sobresaturadas (detección de expresión fuera del intervalo lineal), el tiempo de exposición se redujo a 1 min. La bioluminiscencia se midió como flujo total por órgano (en fotones/seg). Para el análisis solo se usaron imágenes sin sobresaturación. Los pulmones se congelaron rápidamente y se almacenaron a -80 °C.

35 *Actividad de la luciferasa en pulmones homogeneizados*

Los órganos descongelados se pesaron y la mitad de los pulmones explantados se homogeneizó en tampón de lisis con el uso de un homogeneizador FastPrep® -24 (MP Biomedicals). El luminómetro Lumat LB 9507 (Berthold Technologies) añadió automáticamente 100 µL de tampón de luciferina a 75 µL de lisados centrifugados. La actividad de la luciferasa se midió en RLU/s y se convirtió en RLU/órgano.

40 *Resultados*

Este ejemplo demostró la idoneidad de los aditivos definidos en la presente memoria como crioprotectores para complejos basados en lípidos. En una primera etapa, se formaron nanopartículas y se desafiaron con un ciclo de congelación-descongelación en presencia o ausencia de aditivos. El tamaño se midió antes de congelar y después de descongelar. Se eligió el 1,2-propanodiol como representante del grupo de sustancias. El experimento se realizó a diferentes concentraciones de complejo (0,2 y 0,5 mg/mL) así como a diferentes concentraciones de aditivos (5 % y 10 % (p/v)). La diferencia de tamaño se resume en la Tabla 18b.

Tabla 18a: Tamaño estándar de un complejo recién preparado medido con el ZetaSizer Nano ZS (Malvern)

Vehículo	Diámetro hidrodinámico (promedio z [nm])	Pdl
LNP	46,39	0,075
	45,73	0,071
	45,57	0,099

Tabla 18b: Desviación de tamaño en % de diferentes formulaciones de poliplex que contienen 5 % o 10 % de 1,2-propanodiol antes de la congelación versus después de la descongelación.

Aditivo	Concentración de complejo, [mg de ARNm/ml]	
	0,2	0,5
sin	254	n/a
5 % 1,2-propanodiol	16	24
10 % 1,2-propanodiol	9	16

5 Como se muestra en la Tabla 18b, el 1,2-propanodiol estabiliza el tamaño de partícula durante una prueba de congelación-descongelación también para complejos basados en lípidos. Por lo tanto, la eficiencia en la transfección después de la liberación pulmonar se probó en una etapa siguiente. Para este propósito, se aplicó una dosis de 10 pg de ARNm que codifica la luciferasa de luciérnaga a ratones BALB/c mediante inyección de micropulverización en la tráquea. En la Figura 5 y en la Tabla 19 se muestran los resultados de la detección de la proteína producida como medida de la eficiencia de entrega y, por lo tanto, la funcionalidad del vehículo.

La Figura 5 muestra la eficiencia de transfección de nano o micropartículas *in vivo* a base de lípidos después de la congelación con 1,2-propanodiol.

15 Los complejos que contienen el ARNm que codifica la luciferasa de luciérnaga se prepararon con o sin 1,2-propanodiol y se aplicaron intratraquealmente a ratones a través de micropulverización después del almacenamiento a 4 °C o de un ciclo de congelación-descongelación. 24 h después del tratamiento, se anestesió a los ratones y se explantaron los pulmones para medir la actividad de luciferasa, n = 3.

Tabla 19: Datos tabulados de la Figura 5 (incluida la bioluminiscencia en pulmones explantados)

Dosis de ARNm de FLuc/animal	Aditivo		Comentario	Bioluminiscencia (pulmones explantados)		Actividad de luciferasa (homogeneizados)	
	Tipo	Conc. [% w/v]		Flujo total (fotones/seg)	STDEV	RLU/órgano	STDEV
10 µg	complejo fresco	0	fresca	8.106.000	1824000	2263125	98203
	1,2-Propanodiol	5	fresca	18522000	15191171	976173	256302
	1,2-Propanodiol	5	congelada	21634667	21475152	6637646	4472781

20 Como se puede observar en la Figura 5 y la Tabla 19, los complejos congelados en presencia de 1,2-propanodiol mantuvieron su funcionalidad completa después de la aplicación *in vivo*. Por lo tanto, el aditivo no influye negativamente en la eficiencia de la transfección.

Discusión y Conclusión

25 Los datos presentados en este ejemplo muestran que el 1,2-propanodiol no solo permite la congelación de complejos basados en polímeros sino también de complejos basados en lípidos, lo que impide que se agreguen y preserva la actividad *in vivo*.

Breve descripción de las figuras

Figura 1: Eficiencia de transfección, en células A549, de formulaciones de ARNm N/P 10 de brPEI/FLuc que contienen aditivos

Figura 2: Eficiencia de la transfección in vivo de las formulaciones de brPEI/ARNm, después de un ciclo de congelación-descongelación

Figura 3: Eficiencia de la transfección in vivo de las formulaciones de brPEI/ARNm después de un ciclo de congelación-descongelación. Línea punteada: 50 % de actividad de la partícula fresca.

5 Figura 4: Eficiencia de la transfección in vivo de las formulaciones concentradas de polímero/ARNm

Figura 5: Eficiencia de transfección in vivo de nano o micropartículas a base de lípidos después de la congelación en 1,2-propanodiol

REIVINDICACIONES

1. Un dispositivo para formar un aerosol a partir de una composición particulada suspendida en un líquido o para nebulizar tal composición, cuyo dispositivo comprende una composición que comprende
 - (i) una formulación de nano o micropartículas de un agente terapéuticamente activo que está suspendida en una fase líquida, y
 - (ii) al menos un aditivo crioprotector seleccionado de alcanos C3-C5 sustituidos por uno o dos grupos hidroxilo, en el que el agente terapéuticamente activo es un ácido nucleico.
2. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1, en el que el agente terapéuticamente activo es ARNm.
3. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que la formulación de nano o micropartículas muestra un diámetro de partículas promedio en el intervalo de 1 a 4.000 nm, con mayor preferencia de 2 a 2.500 nm y con la máxima preferencia de 5 a 1.000 nm.
4. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que las partículas de la formulación de nano o micropartículas comprenden el ácido nucleico y un excipiente catiónico.
5. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que las partículas de la formulación de partículas comprenden el ácido nucleico en forma de un complejo formado por el ácido nucleico y un oligómero catiónico o un polímero catiónico como el excipiente catiónico.
6. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 4, en el que las partículas de la formulación de partículas comprenden el ácido nucleico en forma de un complejo formado por el ácido nucleico y un lípido catiónico o un lipidoide catiónico como el excipiente catiónico.
7. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el aditivo crioprotector comprende al menos un grupo hidroxilo secundario.
8. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 7, en el que el aditivo crioprotector se selecciona de 1,2-propanodiol, 2-propanol, 1,2-butanodiol, y 1,3-butanodiol.
9. El dispositivo de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el aditivo crioprotector es 1,2-propanodiol.
10. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en el que el aditivo crioprotector está contenido a una concentración de 0,5 a 50 % p/v, con base en el volumen de la fase líquida.
11. El dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en el que el dispositivo es un inhalador seleccionado de un inhalador de dosis medida, un nebulizador y un dispositivo de pulverización nasal.
12. Un aerosol que puede obtenerse mediante el dispositivo de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
13. Una composición para su uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad, en la que la composición comprende
 - (i) una formulación de nano o micropartículas de un agente terapéuticamente activo que está suspendida en una fase líquida, y
 - (ii) al menos un aditivo crioprotector seleccionado de alcanos C3-C5 sustituidos por uno o dos grupos hidroxilo, en la que el agente terapéuticamente activo es un ácido nucleico, y en la que la composición se administra a las vías respiratorias o a través de estas.
14. La composición para su uso de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la composición es para ser administrada a través de la administración pulmonar o a través de la administración nasal.

Fig. 1

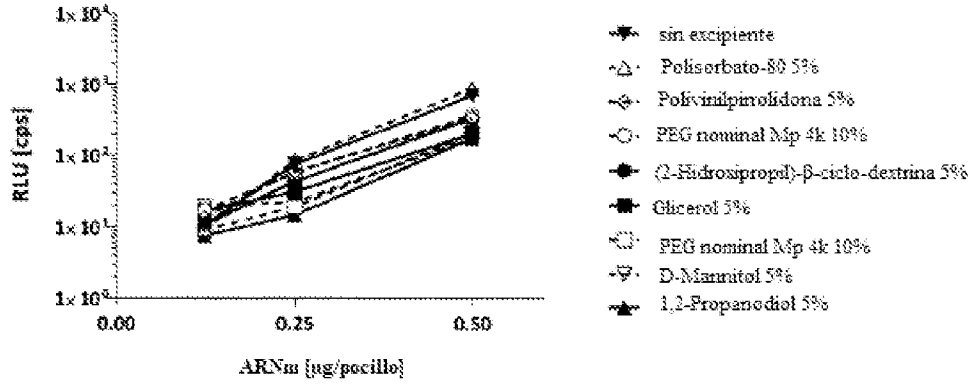


Fig. 2

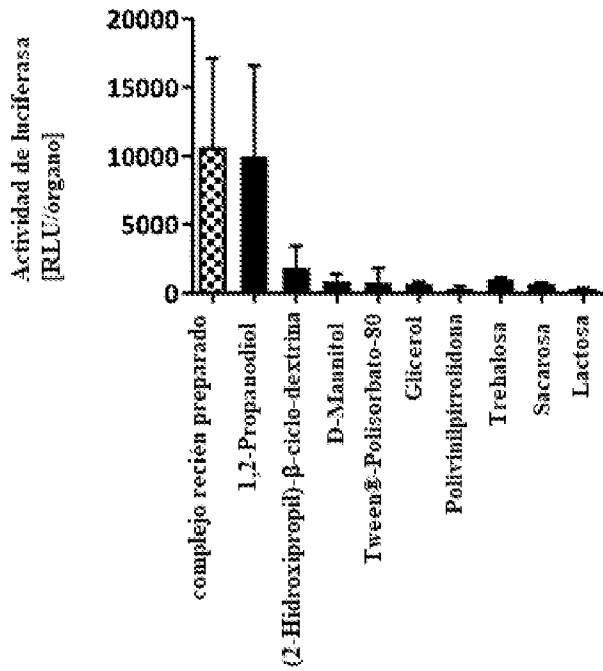


Fig. 3

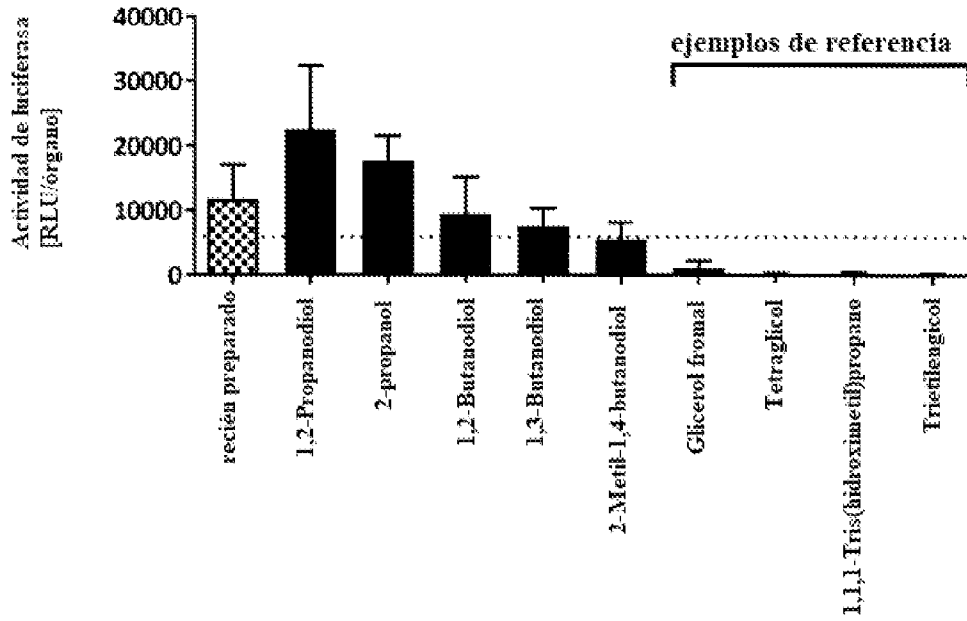


Fig. 4

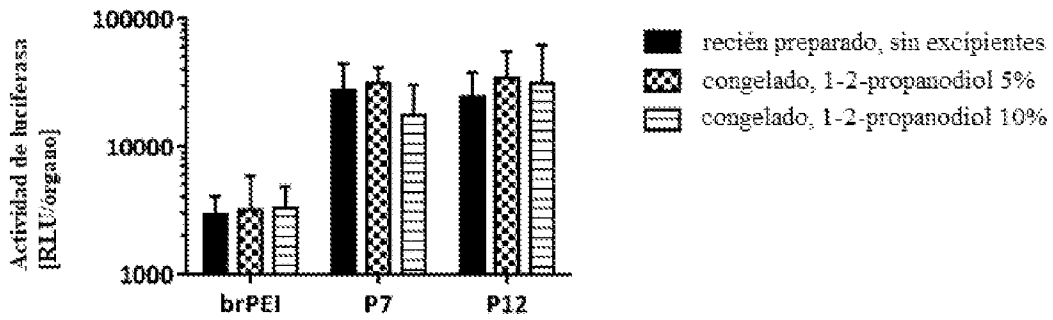


Fig. 5

