

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 826 203**

(51) Int. Cl.:

C12N 15/11 (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)
A61K 48/00 (2006.01)
A61K 31/7105 (2006.01)
A61K 47/59 (2007.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- (86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **07.06.2013 PCT/EP2013/061811**
(87) Fecha y número de publicación internacional: **12.12.2013 WO13182683**
(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.06.2013 E 13735212 (6)**
(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **05.08.2020 EP 2858677**

(54) Título: **Suministro pulmonar de ARN mensajero**

(30) Prioridad:

08.06.2012 US 201261657344 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.05.2021

(73) Titular/es:

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

(72) Inventor/es:

**GEIGER, JOHANNES;
ANEJA, MANISH KUMAR y
RUDOLPH, CARSTEN**

(74) Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 826 203 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

Suministro pulmonar de ARN mensajero

5 La presente invención se refiere a ARNm complejado con polietilenimina (PEI) para proporcionar una combinación que comprende el ARNm y PEI o a una composición farmacéutica que comprende ARNm complejado con PEI para su uso en el tratamiento de un defecto pulmonar mediante expresión del ARNm en el pulmón, en los que dicha combinación o composición farmacéutica va a administrarse al pulmón por inhalación mediante un nebulizador, va a introducirse en las vías respiratorias mediante un nebulizador, se formula para su inhalación mediante un nebulizador y/o se formula para su introducción en las vías respiratorias mediante un nebulizador.

10 Los ARN mensajeros (ARNm) son polímeros que están compuestos por elementos estructurales de fosfatos de nucleósido principalmente con adenosina, citidina, uridina y guanosina como nucleósidos que, como portadores intermedios, llevan la información genética desde el ADN en el núcleo celular al interior del citoplasma, en el que se traduce para dar proteínas. Por tanto, son adecuados como alternativas para la expresión génica.

15 El esclarecimiento de los procesos bioquímicos en la célula y el esclarecimiento del genoma humano han revelado conexiones entre genes deficientes y enfermedades. Por tanto, desde hace mucho tiempo ha existido el deseo de curar enfermedades debidas a genes deficientes mediante terapia génica. Las expectativas eran altas, pero los intentos iniciales fracasaron y solo recientemente se han notificado avances. Un primer enfoque para la terapia génica consistió en llevar el ADN intacto de un gen deficiente o defectuoso al interior del núcleo celular en un vector con el fin de lograr la expresión del gen intacto y, por tanto, proporcionar la proteína defectuosa o que falta. En su mayor parte, estos intentos no fueron satisfactorios y los intentos menos satisfactorios estuvieron cargados con efectos secundarios sustanciales, en particular una tumorigénesis elevada. Solo muy recientemente se notificaron resultados más prometedores que, sin embargo, todavía están lejos de aprobarse.

20 Además, hay enfermedades que se deben a una falta de proteínas o a un defecto de proteína, sin que esto pueda atribuirse a un defecto genético. También en tal caso está considerándose producir las proteínas relevantes *in vivo* mediante administración de ADN. Proporcionar factores que desempeñan una función en el metabolismo y se destruyen o inhiben por motivos patológicos o no patológicos también pueden lograrse mediante una terapia con ácidos nucleicos con ninguno o pocos efectos secundarios.

25 Ya se ha propuesto el uso de ARNm para la terapia de enfermedades hereditarias con el fin de tratar defectos génicos que conducen a enfermedades. La ventaja de esto es que el ARNm solo tiene que introducirse en el citoplasma de una célula, pero no tiene que translocarse al interior del núcleo. La translocación al interior del núcleo es difícil e inefficiente; además, existe un riesgo considerable de que se altere el ADN cromosómico si el vector o partes del mismo llegan a incorporarse en el genoma.

30 Es cierto que puede mostrarse que ARN mensajero transcripto *in vitro* puede expresarse de hecho en tejido de mamífero, sin embargo, surgen obstáculos adicionales al intentar usar ARNm para la terapia de enfermedades. La falta de estabilidad del ARNm tuvo el efecto de que no podía hacerse que la proteína deseada estuviera disponible en una cantidad suficiente en el tejido de mamífero. Se produjo una desventaja sustancial adicional como resultado del hecho de que el ARNm desencadena reacciones inmunológicas considerables. Se supone que estas fuertes reacciones inmunitarias surgen por la unión a receptores de tipo Toll tales como TLR3, TLR7, TLR8 y helicasa RIG-1.

35 Con el fin de prevenir una reacción inmunológica, en el documento WO 2007/024708 A se propuso usar ARN en el que uno de los cuatro ribonucleótidos se sustituye por un nucleótido modificado. En particular, se investigó cómo se comporta el ARNm cuando se sustituye totalmente la uridina por pseudouridina. Se encontró que una molécula de ARN de este tipo es significativamente menos inmunogénica. Además, se propuso adicionalmente usar ARN con una secuencia que codifica para una proteína o un fragmento de proteína, en el que el ARN contiene una combinación de nucleótidos no modificados y modificados, en el que del 5 al 50 % de los nucleótidos de uridina y del 5 al 50 % de los nucleótidos de citidina son respectivamente nucleótidos de uridina modificados y nucleótidos de citidina modificados. Se encontró que una molécula de ARN de este tipo es significativamente menos inmunogénica e incluso más estable. Se propuso además que tal ARN puede usarse para prevenir la muerte en ratones que padecen deficiencia de proteína tensioactiva B (SP-B) mediante aplicación por aerosol intratraqueal repetida en ratones. Por tanto, estas observaciones demuestran la promesa de tal ARN para tratar enfermedades pulmonares potencialmente mortales heredadas y adquiridas y aborda una gran necesidad médica no cubierta. Sin embargo, con respecto a la aplicación en pacientes, este procedimiento de aplicación aún no era adecuado para la aplicación por aerosol repetida debido a la anestesia requerida y la degradación de ARN usando nebulizadores convencionales usados clínicamente.

40 45 50 55 60 Con el fin de poder proporcionar al pulmón del organismo las proteínas necesarias beneficiosas y/o tratar una enfermedad debida a proteínas que faltan o deficientes con ARN, es deseable tener disponible un método para la aplicación por aerosol repetida que evite la anestesia repetida del paciente. Sin embargo, al mismo tiempo, este método no debe provocar una disminución de la eficacia de ARN hasta un grado significativo.

65 En el documento EP 1 173 224 B1 se propuso usar formulaciones de polietilenimina (PEI) 25 kDa/ADN para el

suministro por aerosol de genes al pulmón adecuadas para superar el problema no resuelto anteriormente de anestesia repetida y una notable disminución de la eficiencia que acompaña al proceso de nebulización en comparación con la transfección *in vitro*. Se encontró que las formulaciones de PEI/ADN son resistentes a la reducción inducida por nebulizador en chorro de la eficiencia de transfección y son superiores a formulaciones basadas en lípidos anteriormente optimizadas cuando se suministran *in vivo* mediante nebulizador en chorro. Específicamente, el documento EP 1 173 224 B1 da a conocer un método de direccionamiento de terapia tal como terapia génica a través de las vías respiratorias, que comprende la etapa de suministrar dispersiones acuosas de una macromolécula genética complejada con polietilenimina mediante aerosol de partículas pequeñas a través de las vías respiratorias de un individuo. Los ejemplos representativos de macromoléculas genéticas según los métodos de la invención incluyeron ADN, ARN y otras especies de ácido nucleico. Sin embargo, la invención se ha reducido a la práctica en los ejemplos comprendidos en la patente únicamente para el suministro de ADN, pero no para ARNm. Además, se formaron complejos de ADN de plásmido, que codifica para un gen de interés, con PEI mezclando ADN de plásmido disuelto en agua con cantidades apropiadas de PEI disuelta en PBS. Sin embargo, Rudolph *et al.* (Mol Ther. 2005, 12: 493-501) demostraron que los complejos de PEI-ADN, cuando se ensamblaron y se nebulizaron en agua destilada hiposmótica, produjeron niveles de expresión 57 y 185 veces superiores en pulmones de ratón que aquellos en glucosa isotónica al 5 % o solución salina tamponada con Hepes, respectivamente. Sorprendentemente, los complejos de PEI-ADN cuando se ensamblaron y se nebulizaron en PBS fueron totalmente ineficaces. Esto se atribuyó principalmente al hecho de que los vectores génicos de PEI formulados en PBS dieron como resultado diámetros grandes (848 ± 142 nm) que eran cinéticamente inestables y condujeron a precipitación. También se encontró que cantidades de nanogramos en aerosol de ADNp (350 ng) complejado con PEI produjeron niveles de transfección 15 veces superiores a una dosis 140 veces superior (50 µg) del mismo vector aplicado directamente a los pulmones de ratones mediante intubación intratraqueal.

Además, Bettinger *et al.* (Nucleic Acids Res. 2001, 29: 3882-91) demostraron que los lipoplejos, pero no los poliplejos basados en polietilenimina (PEI ramificada de 25 y PEI lineal de 22 kDa), polí(L-lisina) (PLL, 54 kDa) o dendrímeros, mediaban en la traducción eficiente de ARNm en células B16-F10 transfectadas. La falta de expresión con PEI de 25 kDa/ARNm o PLL de 54 kDa/ARNm en un ensayo de traducción libre de células y tras la inyección citoplasmática en células Rat1 indicó que estos poliplejos eran demasiado estables como para liberar ARNm. Se demostró que la fuerza de interacción electrostática entre el ARNm y el agente de transfección tenía un efecto drástico sobre el nivel de expresión logrado, siendo los vectores de poliplejos termodinámicamente estables, por ejemplo, PEI-ARNm, siendo menos adecuados para la traducción de ARNm. Disminuir la interacción electrostática entre el portador y el ARNm usando policationes más cortos produjo aumentos principales en la expresión, logrando los poliplejos de ARNm formados usando PEI de bajo peso molecular y niveles PLL 5 veces mayores de expresión de luciferasa que DOTAP/ARNm. Sin embargo, los poliplejos formados usando policationes de bajo peso molecular perdieron su actividad endosmótica y requirieron cloroquina para mediar en la expresión de ARNm. Se restauró la endosmólisis conjugando PEI de bajo peso molecular con el péptido activo en membrana melitina, y se demostraron altos niveles de expresión de ARNm en ausencia de cloroquina. En conjunto, estas observaciones demuestran que la unión de ARNm monocatenario a polímeros catiónicos es en gran medida más fuerte que la unión de ADNp. Esto se ha confirmado adicionalmente por Huth *et al.* (J. Gene Med. 2006, 8: 1416-1424) quienes sugirieron que el ARN citosólico está implicado en la liberación de ADNp a partir de polímeros catiónicos como condición previa para la entrada nuclear, transcripción y expresión transgénica satisfactoria. En conclusión, estas observaciones sugirieron que PEI de 25 kDa no puede mediar en el suministro de ARNm funcional en células.

Dado que el tratamiento repetido de manera continua que implica intubación no es compatible con requisitos de calidad de vida, la tarea subyacente a la presente invención era proporcionar un método adaptado y no invasivo para el suministro pulmonar de ARN mensajero que dé como resultado la expresión pulmonar de una proteína codificada por dicho ARNm.

La técnica anterior es deficiente en cuanto a métodos no invasivos para el suministro pulmonar de ARNm.

Por tanto, un objetivo de la presente invención es proporcionar un método para el suministro de un agente terapéutico de ARNm mediante aplicación pulmonar no invasiva que dé como resultado la producción de niveles eficaces de proteína codificada dentro del pulmón.

Por tanto, la presente invención proporciona ARNm que está complejado con polietilenimina (PEI) para proporcionar una combinación que comprende el ARNm y PEI para su uso en el tratamiento de un defecto pulmonar mediante expresión del ARNm en el pulmón, en el que

- la combinación que comprende el ARNm y PEI va a administrarse al pulmón en el que entra en células pulmonares; y

- el ARNm va a expresarse en las células pulmonares, y

en el que el ARNm codifica para regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), proteína tensioactiva B (SPB), miembro 3 de la subfamilia A de casete de unión a ATP (ABCA3) o alfa-1 antitripsina (A1AT), proteína tensioactiva C (SPC), eritropoyetina, factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos,

hepcidina, enzima II convertidora de la angiotensina o antígenos de patógenos virales o bacterianos, en el que dicha combinación va a administrarse al pulmón por inhalación mediante un nebulizador, va a introducirse en las vías respiratorias mediante un nebulizador, se formula para su inhalación mediante un nebulizador y/o se formula para su introducción en las vías respiratorias mediante un nebulizador. La presente invención proporciona además una

5 composición farmacéutica que comprende ARNm complejado con PEI para su uso en el tratamiento de un defecto pulmonar mediante expresión del ARNm en el pulmón, en la que el ARNm codifica para regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), proteína tensioactiva B (SPB), miembro 3 de la subfamilia A de casete de unión a ATP (ABCA3) o alfa-1 antitripsina (A1AT), proteína tensioactiva C (SPC), eritropoyetina, factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, hepcidina, enzima II convertidora de la angiotensina o antígenos de patógenos virales o bacterianos, y en la que dicha composición farmacéutica va a administrarse al pulmón por inhalación mediante un nebulizador, va a introducirse en las vías respiratorias mediante un nebulizador, se formula para su inhalación mediante un nebulizador y/o se formula para su introducción en las vías respiratorias mediante un nebulizador. Además, en el presente documento se da a conocer un método para expresar un ARNm en el pulmón en el que

10 15 - el ARNm que va a expresarse se combina con polietilenimina (PEI) para proporcionar una combinación que comprende el ARNm y PEI;

20 - la combinación que comprende el ARNm y PEI se administra al pulmón en el que entra en células pulmonares; y
- el ARNm se expresa en las células pulmonares.

La presente invención es específicamente adecuada en medicina para seres humanos. Por tanto, el pulmón según la presente invención es preferiblemente el pulmón de un paciente humano, preferiblemente un paciente humano con un defecto pulmonar. El defecto pulmonar que va a tratarse según la invención se selecciona del grupo de deficiencia de proteína tensioactiva B (SPB), deficiencia de miembro 3 de la subfamilia A de casete de unión a ATP (ABCA3), fibrosis quística, deficiencia de alfa-1 antitripsina (A1AT), cáncer de pulmón, deficiencia de proteína tensioactiva C (SPC), proteinosis alveolar, sarcoidosis, bronquitis aguda y crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma bronquial, bronquiectasia, neumoconiosis, asbestosis, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), síndrome de dificultad respiratoria neonatal (SDRN), edema pulmonar, eosinofilia pulmonar, neumonía de Löffler, síndrome de Hamman-Rich, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedades pulmonares intersticiales, discinesia ciliar primaria, hipertensión arterial pulmonar (HAP) y deficiencia de STAT5b.

35 Además, el pulmón del paciente humano puede servir como biorreactor para la secreción de proteínas expresadas por el ARNm a partir de las células pulmonares al interior de la circulación sanguínea tales como eritropoyetina, defectos del complemento tales como deficiencia de proteína C, púrpura trombocitopénica trombótica (TTP, deficiencia de ADAMTS 13) y hemocromatosis congénitas (por ejemplo, deficiencia de hepcidina).

40 La expresión de un ARNm a partir de células pulmonares también puede usarse para la vacunación contra enfermedades infecciosas pulmonares tales como infección por virus sincitial respiratorio (VSR), infección por virus parainfluenza (VPI), infección por virus influenza, infección por rinovirus y síndrome respiratorio agudo grave (infección por coronavirus (SARS-CoV), tuberculosis, infección por *Pseudomonas aeruginosa*, infección por *Burkholderia cepacia*, infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e infección por *Haemophilus influenzae*. Para tales fines de vacunación, el ARNm suministrado codifica para uno o más antígenos del patógeno.

45 50 La PEI que va a administrarse en el transcurso de la presente invención habitualmente no es crítica (Morimoto *et al.*, Mol. Ther. 7 (2003), 254-261), sin embargo, resulta ventajoso dentro del transcurso de la presente invención usar una PEI que tiene un peso molecular de 1 kDa a 1000 kDa, preferiblemente desde 10 kDa hasta 50 kDa, especialmente desde 20 hasta 30 kDa.

55 60 Según una realización de la presente invención la PEI comprende un ligando de direccionamiento, preferiblemente un ligando de receptor de IP₁, más preferiblemente un análogo de prostaciclina, especialmente iloprost (ácido 5-((E)-(1S,5S,6R,7R)-7-hidroxi-6-[(E)-(3S,4RS)-3-hidroxi-4-metil-1-octen-6-inil]-bi-ciclo[3.3.0]octan-3-iliden}pentanoico) o treprostinilo (ácido (1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-hexahidro-2-hidroxi-1-[(3S)-3-hidroxiocil]-1H-benz[f]inden-5-il]oxi]acético); o ligandos de receptor β₂-adrenérgico, especialmente clenbuterol (Elfinger *et al.*, J. Control. Release 2009, 135: 234-241), lactoferrina (Elfinger *et al.*, Biomaterials 2007, 28: 3448-3455), ácidos urónicos (Weiss *et al.*, Biomaterials 2006, 27: 2302-2312) o lectinas (Bies *et al.*, Adv. Drug Deliv. Rev. 2004, 56: 425-435).

Según una realización preferida de la presente invención, la combinación para su uso o la composición farmacéutica para su uso no comprende un ligando de direccionamiento.

65 70 El uso de ligando de receptor de IP₁, más preferiblemente un análogo de prostaciclina, para el suministro específico de diana de la formulación farmacéutica basada en PEI a células pulmonares, especialmente a células epiteliales bronquiales o alveolares, se ha dado a conocer y puesto a disposición por el documento WO 2011/076391 A.

Con el método dado a conocer en el presente documento, se prefiere suministrar un ARNm a células pulmonares que

tiene un beneficio médico, especialmente ARNm que sustituye, anula, antagoniza o suprime un gen que tiene un efecto patógeno en el pulmón o para este paciente. Se prefiere específicamente suministrar un ARNm que sustituye a un gen defectuoso en esa célula pulmonar.

5 Según la presente invención, el ARNm codifica para regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), proteína tensioactiva B (SPB), miembro 3 de la subfamilia A de casete de unión a ATP (ABCA3) o alfa-1 antitripsina (A1AT), proteína tensioactiva C (SPC), factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, eritropoyetina, hepcidina, enzima II convertidora de la angiotensina o antígenos de patógenos virales o bacterianos.

10 La presente invención también se refiere a una composición farmacéutica que comprende ARNm complejado con PEI para su uso en el tratamiento de un defecto pulmonar mediante expresión del ARNm en el pulmón, en la que el ARNm codifica para regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), proteína tensioactiva B (SPB), miembro 3 de la subfamilia A de casete de unión a ATP (ABCA3) o alfa-1 antitripsina (A1AT), proteína tensioactiva C (SPC), eritropoyetina, factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, hepcidina, enzima II convertidora de la angiotensina o antígenos de patógenos virales o bacterianos.

15 También se da a conocer en el presente documento una composición farmacéutica que comprende ARNm y PEI para su uso en un método para expresar el ARNm en el pulmón. La composición farmacéutica según la presente invención es específicamente adecuada para el tratamiento de un defecto pulmonar, especialmente un defecto pulmonar seleccionado del grupo de deficiencia de proteína tensioactiva B (SPB), deficiencia de miembro 3 de la subfamilia A de casete de unión a ATP (ABCA3), fibrosis quística, deficiencia de alfa-1 antitripsina (A1AT); cáncer de pulmón, deficiencia de proteína tensioactiva C (SPC), proteinosis alveolar, sarcoidosis, bronquitis aguda y crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma bronquial, bronquiectasia, neumoconiosis, asbestosis, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), síndrome de dificultad respiratoria neonatal (SDRN), edema pulmonar, eosinofilia pulmonar, neumonía de Löffler, síndrome de Hamman-Rich, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedades pulmonares intersticiales, discinesia ciliar primaria, hipertensión arterial pulmonar (HAP) y deficiencia de STAT5b, defectos del complemento, especialmente deficiencia de proteína C, púrpura trombocitopénica trombótica y hemocromatosis congénita, especialmente deficiencia de hepcidina; enfermedades infecciosas pulmonares, preferiblemente infección por virus sincitial respiratorio (VSR), infección por virus parainfluenza (VPI), infección por virus influenza, infección por rinovirus y síndrome respiratorio agudo grave (infección por coronavirus (SARS-CoV), tuberculosis, infección por *Pseudomonas aeruginosa*, infección por *Burkholderia cepacia*, infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e infección por *Haemophilus influenzae*.

20 35 Una composición farmacéutica preferida según la presente invención comprende además al menos un fluorocarbono.

En una realización, el ARNm para su uso o la composición farmacéutica para su uso según la invención consiste en el ARNm para su uso o la composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en los que dicha combinación o composición farmacéutica consiste en

40 (i) dicho ARNm complejado con PEI;

(ii) dicho ARNm complejado con PEI y

45 (A) agua destilada;

(B) agua farmacéuticamente aceptable/agua para inyección (WFI);

(C) agua ultrapura esterilizada en autoclave; o

50 (D) agua corriente; o

(iii) (i) o (ii) y un(os) portador(es) farmacéuticamente aceptable(s) y/o un(os) compuesto(s) auxiliar(es) adicional(es).

55 El tratamiento por aerosol con perfluorocarbonos muestra generalmente un intercambio de gases mejorado y una reacción inflamatoria pulmonar reducida independientemente de la estructura molecular y la presión de vapor de los perfluorocarbonos. Aunque diferencias en la presión de vapor y la estructura molecular pueden explicar estrategias de dosificación óptimas variables, se mostró que varios perfluorocarbonos diferentes eran principalmente adecuados para el tratamiento por aerosol, por ejemplo, perfluorocicloéter (FC77), bromuro de perfluoroctilo o perfluorotributilamina (FC43).

60 Por consiguiente, el ARNm complejado con PEI o la composición farmacéutica que comprende el ARNm complejado con PEI de la presente invención se proporciona preferiblemente como un aerosol. En una realización preferida, la composición farmacéutica según la presente invención destinada a la administración pulmonar se combina con perfluorocarbono, que se administra de manera previa o simultánea con la composición farmacéutica con el fin de aumentar la eficiencia de transfección.

En una realización preferida, la combinación de ARNm/PEI según la invención se proporciona en una forma adecuada para la captación a través del pulmón, por ejemplo, por inhalación. Los expertos en la técnica conocen fórmulas adecuadas para esto. En este caso, la preparación está en una forma que puede introducirse en las vías respiratorias mediante nebulizadores o inhaladores normales, por ejemplo, como un líquido para su nebulización o como un polvo. Se conocen dispositivos para la administración como líquido, y resultan adecuados nebulizadores por ultrasonidos o nebulizadores con una membrana oscilante perforada que funcionan con bajas fuerzas de cizalladura en comparación con nebulizadores por chorro de boquilla. También son adecuados los aerosoles de polvo. ARNm complejado con PEI está disponible después de la liofilización con el azúcar sacarosa como polvo que entonces puede triturarse hasta un tamaño respirable y además muestra actividad biológica.

Preferiblemente, la combinación de ARNm/PEI se administra por vía intratraqueal como aerosol.

En una realización específicamente preferida de la presente invención, la preparación farmacéutica se proporciona como un aerosol que contiene partículas magnéticas, especialmente preparaciones en las que el aerosol contiene partículas magnéticas que tienen un diámetro de al menos 5 nm y como máximo 800 nm junto con la combinación de ARNm/PEI (documento EP 1 924 244 A). Las partículas magnéticas tienen habitualmente un diámetro de al menos 50 nm y como máximo 750 nm, preferiblemente de al menos 100 nm y como máximo 700 nm, más preferiblemente de al menos 150 nm y como máximo 600 nm, todavía más preferiblemente de al menos 200 nm y como máximo 500 nm, de manera particularmente preferible de al menos 250 nm y como máximo 450 nm, lo más preferiblemente de al menos 300 nm y como máximo 400 nm.

Según una realización preferida, la PEI se acopla a las partículas magnéticas en el aerosol.

Preferiblemente, el aerosol que contiene partículas magnéticas según la presente invención consiste en metales y/u óxidos y/o hidróxidos de los mismos o contiene los mismos. Según una realización preferida, las partículas magnéticas consisten en metales, o contienen los mismos, y se seleccionan del grupo que consiste en hierro, cobalto o níquel, óxidos o hidróxidos de hierro magnéticos, tales como Fe_3O_4 , gamma- Fe_2O_3 , óxidos o hidróxidos dobles de iones de hierro di o trivalentes con otros iones de metales di o trivalentes, tales como Co^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , Gd^{3+} , Dy^{3+} o Sm^{3+} , y cualquier mezcla de los mismos.

Al aplicar tales aerosoles que contienen partículas magnéticas, el aerosol que contiene partículas magnéticas puede depositarse mediante un campo magnético sobre la superficie de la región de las vías respiratorias y/o el pulmón que va a tratarse. Preferiblemente, el campo magnético tiene una intensidad de campo de al menos 100 mT (militesla), al menos 200 mT, al menos 500 mT o al menos 1 T (tesla). Preferiblemente, el campo magnético tiene un gradiente de campo magnético de más de 1 T/m o más de 10 T/m. Según una realización preferida de este método, el campo magnético es un campo magnético pulsante, oscilante o pulsante-oscilante. Preferiblemente, el campo magnético se hace coincidir dinámicamente con la respiración del paciente y solo es activo durante las pausas en reposo entre inhalación y exhalación de exhalación e inhalación (documento EP 1 924 244 A).

Resulta particularmente adecuada PEI de 25 kDa que se usa para formular ARNm que codifica para una proteína o fragmento de proteína y en la que la formulación se genera en agua destilada y que se aplica como un aerosol al pulmón usando un nebulizador en chorro.

Realizaciones específicamente preferidas de la presente invención se preparan usando tampones acuosos y disolventes con bajo pH y baja conductividad. El tampón de PBS tiene un pH de 7,4 y una conductividad de $16.500 \pm 500 \mu\text{S}/\text{cm}$ (a 25 °C). El ARNm en las composiciones según la presente invención muestra sorprendentemente una estabilidad creciente si se aplican disoluciones de conductividad inferior y/o pH inferior. Por ejemplo, el agua ultrapura esterilizada en autoclave tiene una conductividad de $1 \pm 0,2 \mu\text{S}/\text{cm}$ (la farmacopea de los EE. UU. requiere un límite superior para la conductividad a 25 °C de 1,3) y un pH de 5,0 a 7,0. El agua corriente filtrada a través de un filtro de 0,2 µm tiene una conductividad de $300 \pm 5 \mu\text{S}/\text{cm}$. En realizaciones preferidas de la presente invención, se aplican tampones acuosos y disolventes con pH inferior y conductividad inferior al tampón de PBS. Por tanto, la composición farmacéutica según la presente invención tiene preferiblemente un pH de menos de 6,5, preferiblemente de 3 a 6, especialmente de 4 a 5,5 y/o una conductividad de 25 °C (es decir, una conductividad a 25 °C) de $10000 \mu\text{S}/\text{cm}$ o inferior, preferiblemente de 1000 o inferior, especialmente de 100 o inferior. Por ejemplo, una realización específicamente preferida contiene agua farmacéuticamente aceptable (agua para inyección), tal como se define en la farmacopea de los EE. UU. (en lugar de un tampón, tal como PBS).

Evidentemente, la preparación farmacéutica según la presente invención puede contener además portadores farmacéuticamente aceptables y/o compuestos auxiliares adicionales, especialmente compuestos habitualmente proporcionados en composiciones de aerosol que van a suministrarse a pulmones humanos.

Se han usado virus deficientes para la replicación de manera muy satisfactoria en el campo de la terapia génica debido a su alta eficiencia de transfección. Sin embargo, el riesgo de mutagénesis por inserción y de inducción de respuestas inmunitarias no deseadas todavía sigue siendo crítico para su aplicación segura. Por otro lado, se han investigado intensamente vectores no virales para el suministro de ADN de plásmido (ADNp) como una alternativa más segura,

aunque su eficiencia de transferencia génica todavía es muchas veces inferior a la de vectores virales, lo cual se ha atribuido predominantemente al transporte insuficiente de ADNp al interior del núcleo. En vez de ADNp, recientemente ha surgido el ARN mensajero (ARNm) como una alternativa atractiva y prometedora en el campo del suministro génico no viral. Esta estrategia combina varias ventajas en comparación con el ADNp: i) puede evitarse la membrana nuclear, que es un obstáculo principal para el ADNp, porque el ARNm ejerce su función en el citoplasma; ii) puede excluirse el riesgo de mutagénesis por inserción; iii) se omite la determinación y el uso de un promotor eficiente; iv) es posible una aplicación repetida; v) el ARNm también es eficaz en células no en división, y vi) puede ser evitable la inmunogenicidad inducida por vector.

- 5 10 Los vehículos de transferencia génica basados en ARNm han surgido como alternativas atractivas a vehículos compuestos por ADN para el posible tratamiento de trastornos genéticos o vacunación (antitumoral). Su aplicación satisfactoria se ha demostrado en inmunoterapia contra el cáncer, no solo porque es posible suministrar todos los epítotos de antígenos enteros en una etapa juntos, sino porque además la manipulación, así como la purificación son bastante sencillas. Además, esta estrategia tiene varias ventajas en cuanto a la seguridad farmacéutica porque el ARNm no se integra en el genoma y la transfección sigue siendo transitoria. El ARNm que codifica para antígenos versátiles en combinación con el suministro a células dendríticas (DC) es un enfoque fuerte y prometedor para inducir respuesta inmunitaria en pacientes con cáncer.

20 25 Hasta ahora, se ha usado en gran medida ADN de plásmido (ADNp) para transferencia génica no viral. Sin embargo, apenas puede transfectarse al interior de células de mamífero no en división y, además, motivos de CpG de ADN no metilado bacteriano inducen una fuerte respuesta inmunitaria a través de receptor de tipo Toll 9 (TLR9). Por ejemplo, solo el 1-10 % de las DC se transfecan por medio de electroporación, polímeros catiónicos o lípidos catiónicos. Por otro lado, se ha mostrado anteriormente que las eficiencias de transfección mediante electroporación de ARNm alcanzan hasta el 95 % de células transfectadas. Estas observaciones sugieren que la transferencia de ARNm es mucho más eficaz en comparación con la transferencia de ADNp, principalmente porque el ARNm no tiene que transportarse al interior del núcleo. Por consiguiente, se ha notificado una expresión de proteína temprana y drásticamente superior.

30 35 Aunque deben enfatizarse las ventajas indicadas anteriormente para el uso de ARNm para transferencia génica no viral, debe observarse que el ARNm experimenta aproximadamente 13 mutaciones de nucleósidos diferentes incluyendo metilación en células eucariotas, y el ARNm transcripto *in vitro* provoca fuertes respuestas inmunitarias mediadas por TLR3, TLR7 y TLR8, lo cual representa un desafío principal para su aplicación satisfactoria *in vivo*. Sin embargo, los nucleósidos modificados pueden contribuir a una reducción de estos efectos inmunoestimulantes, tal como se comentará más adelante.

35 40 El ARNm maduro en células eucariotas consiste en cinco porciones significativas: la estructura de caperuza ([m7Gp3N (N: cualquier nucleótido)], la región no traducida en 5' (5'UTR), un marco de lectura abierto (ORF), la región no traducida en 3' (3'UTR) y una cola de 100-250 residuos de adenosina (cola de poli(A)). Puede obtenerse ARNm transcripto *in vitro* a partir de ADN de plásmido que alberga un promotor de bacteriófago, tal como T7, SP6 o T3. La transcripción *in vitro* es una técnica común que usa kits comercialmente disponibles para obtener cantidades suficientes de ARNm funcional. Hasta ahora, la viabilidad y el refinamiento técnico se han mejorado drásticamente.

45 50 Se encontró que de una tercera parte a la mitad de las caperuzas se incorporan en la orientación inversa durante la transcripción *in vitro*, haciendo que no puedan reconocerse por la proteína de unión a caperuza, el factor de inicio eucariota 4E (eIF4E). En vez de la estructura de caperuza normal, se descubrió que un análogo de caperuza anti-inverso (ARCA), m₂^{7,3'}O Gp₃G y m⁷3'dGp₃G en los que un grupo 3'OH de una caperuza normal se elimina o sustituye por OCH₃ podía evitar la incorporación de caperuza en la orientación errónea. Posteriormente, se ha notificado un alto número de modificaciones en ARCA. De manera enigmática, se encontró que modificaciones no solo en la posición C3', sino también en la posición C2', previenen la incorporación inversa. Además, los ARCA de tetrafosfato pueden fomentar la traducción de manera más eficiente que otros análogos de caperuza. Como resultado, los transcritos con caperuza de ARCA *in vitro* (ARCA-ARNm) mostraron una eficiencia de traducción significativamente superior en comparación con transcritos con caperuza normales (CAP-ARNm) en un lisado de reticulocitos de conejo. Además, se ha notificado que se encontró que m₂^{7,3'}O Gpp_{CH2}pG o m₂^{7,3'}O Gp_{CH2}ppG, en los que el oxígeno de puente en la unión α-β o la unión β-γ, estaba sustituido por un grupo metileno, respectivamente, eran resistentes a la hidrólisis por Dcp2 humana, una de las enzimas de eliminación de caperuza, *in vitro*, y aumentaron la estabilidad de ARNm (Grudzien *et al.*, 2006. J Biol Chem, 281, 1857-67). Sin embargo, m₂^{7,3'}O Gpp_{CH2}pG solo mostró una afinidad del 52-68 % por eIF4E en comparación con m₂^{7,3'}O Gp₃G. Recientemente se notificó que un fosforotioato en ARCA (S-ARCA) estabilizó y aumentó la eficiencia de traducción. Se encontró que el ARNm de luciferasa (luc) con caperuza con una sustitución de azufre para un oxígeno no de puente en el resto de β-fosfato en ARCA, m₂^{7,2'}O Gpp_spG (D2), se traducía de manera 5,1 veces más eficiente que una caperuza normal. Otra forma diastereoisomérica (D1) mostró una eficiencia de traducción 2,8 veces superior. No hubo ninguna diferencia significativa en la eficiencia de traducción entre S-ARCA y ARCA. Sin embargo, se encontró que t_{1/2} en D2 (257 min) estaba fuertemente prolongado en comparación con una caperuza normal (86 min) o ARCA (155 min). Por tanto, parece que el fosforotioato contribuye a la resistencia a la hidrólisis.

65 65 La cola de poli(A) desempeña un papel importante tanto en la traducción de ARNm como en la estabilidad. La cola de

poli(A) se une a proteína de unión a poliadenosilo (PABP). PABP interacciona con el extremo N-terminal de eIF4G, lo cual conduce a la circularización de ARNm. Además, la cola de poli(A) puede unirse a numerosas PABP, cuya interacción con eIF4G da como resultado un aumento de la afinidad de eIF4E por la estructura de caperuza. La interacción caperuza-poli(A) resulta de manera cooperativa a partir de las interacciones físicas entre los extremos 5' y 3' de ARNm. Una vez eliminada la cola de poli(A) o acortada hasta menos de 12 residuos, se produce degradación de ARNm mediante la escisión de la estructura de caperuza en 5' y la digestión exonucleotídica de 5' a 3' o la degradación de 3' a 5'. Estas observaciones ilustran que la cola de poli(A) es muy importante para inhibir la eliminación de caperuza, así como la degradación de ARNm. Para la transcripción *in vitro*, a menos que el ADN de plásmido de molde contenga una cola de poli(dA/T), puede poliadenilarse posteriormente por la poli(A) polimerasa. Sin embargo, en este caso, la longitud de la cola de poli(A) puede variar de una reacción a otra y dentro de un enfoque, aunque esta variación sigue siendo sorprendentemente baja.

De manera enigmática, se ha notificado que, aunque la traducción de ARNm poliadenilado con caperuza se inhibía mediante la adición de poli(A) exógena en trans, la traducción de ARNm no poliadenilado con caperuza más bien se estimulaba a determinadas concentraciones de poli(A). Sin embargo, la adición de poli(A) exógena que consiste en 10-180 residuos en trans en lisados de reticulocitos de conejo estimuló 11 veces la traducción de ARNm con caperuza con una cola de poli(A) de 100 residuos de adenosina. La adición de una cola de poli(A) en el intervalo de 15-600 residuos dio como resultado una estimulación de 2,3 veces de la expresión de proteína mediante cotransfección de ARCA-ARNm de luc-A100 usando lipofección.

Además, se ha notificado que tanto la estructura de caperuza como la cola de poli(A) contribuyen individualmente al nivel de expresión de proteína. ARCA-ARNm de luc-A64 o 100 mostraron una actividad de luciferasa 25 veces y 50 veces superior a CAP-ARNm de luc-A64 o 100, respectivamente, usando lipofección en células dendríticas de ratón (JAWSII). Además, ARCA-ARNm de luc-A100 mostró una actividad de luciferasa 700 veces superior a CAP-ARNm de luc-A64. Por tanto, una larga cola de poli(A) en combinación con una estructura de caperuza modificada, ARCA, mejora en gran medida la eficiencia de expresión en células dendríticas.

Se encuentra en la naturaleza de las reacciones enzimáticas que la actividad de luciferasa solo mide indirectamente los niveles de expresión de proteína, lo cual significa que faltan por determinarse los efectos reales sobre la eficiencia de traducción. Se examinó si la longitud de la cola de poli(A) (A0, A20, A40, A60, A80 y A100) afecta a los niveles de expresión no solo en células dendríticas sino también en otros tipos de células. De manera interesante, se encontró que la eficiencia de traducción aumentó usando una cola de poli(A) con una longitud de hasta A60, después disminuyó al aumentar la longitud de cola de poli(A) en UMR-106, una línea celular de osteosarcoma de tipo osteoblastos de rata. Por tanto, el efecto de la longitud de poli(A) sobre la traducción puede ser dependiente del tipo de célula.

También se investigó el impacto de modificaciones de ARNm sobre su estabilidad y eficiencia de traducción en células dendríticas. Se descubrió que diversos factores importantes aumentaban la estabilidad y eficiencia de traducción de ARNm mediante i) la extensión de la longitud de poli(A) hasta A120; ii) el uso de enzimas de restricción tipo IIS tales como Sapl y Bpil para evitar una proyección en el extremo 3' de la cola de poli(A) y para obtener una cola de poli(A) de extremo libre al realizar la linealización del vector de plásmido de molde; iii) dos 3'UTR secuenciales del gen de β-globina humano clonado entre ORF y la cola de poli(A).

Se ha evaluado una variedad de reactivos de transfección para determinar su capacidad para suministrar ARNm. Aunque hasta ahora la mayoría de las publicaciones sugieren lipoplejos para la transfección de ARNm, los poliplejos basados en polietilenimina (PEI, de 25 y 22 kDa) condujeron a resultados más bien malos. Sin embargo, el uso de policationes solo se ha descrito con poca frecuencia en la bibliografía, aunque DEAE-dextrano, poli(L-lisina) y dendrímeros pudieron transfectar ARNm al interior de células *in vitro*.

La viabilidad de la transferencia de ARNm en células de mamífero usando lípidos catiónicos ya se describió a finales de la década de 1980. Se usó DOTMA, un lípido catiónico sintético, incorporado en un liposoma (lipofectina) para transfectar de manera eficiente ARNm al interior de diferentes líneas celulares *in vitro*. Diferentes cantidades de ARNm aplicado produjeron una respuesta lineal de actividad de luciferasa. Actualmente, DOTAP parece ser el lípido catiónico más eficiente y el más ampliamente usado, relativamente económico y eficiente en aplicaciones de suministro de ARNm tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, pueden usarse polímeros catiónicos para transfección de ARNm. Determinados vectores sintéticos basados en policationes reducibles superaron por mucho las eficiencias de transfección de ARNm de PEI de 25 kDa. Sin embargo, queda por investigar si esos vectores modificados pueden usarse directamente para la transferencia génica *in vivo*. Con respecto a los mecanismos de transfección, se encontró que la fuerza de unión entre el polímero o lípido catiónico representaba uno de los parámetros críticos que afectaban a la eficiencia de expresión de ARNm. Mientras que polímeros catiónicos tales como PEI ramificada de 25 kDa y PEI lineal de 22 kDa, que eran eficaces para el suministro de ADN de plásmido y se unían estrechamente a ARNm, no dieron como resultado una expresión detectable, PEI de bajo peso molecular de 2 kDa se unió a ARNm de manera menos eficiente, pero condujo a altos niveles de expresión en presencia de agentes endosmólíticos tales como cloroquina o melitina químicamente unida comparable a DOTAP. Estas observaciones demuestran que la unión de ARNm monocatenario a polímeros catiónicos es más fuerte que la unión de ADNp. Se sugirió que ARN citosólico está implicado en la liberación de ADNp a partir del polímero catiónico como una condición previa para la entrada nuclear y la transcripción. Por tanto, el diseño de polímeros catiónicos novedosos para el suministro de ARNm tiene que

abordar cuidadosamente la fuerza de unión de ácido nucleico y polímeros catiónicos eficientes usados para el suministro de ADNp pueden no ser adecuados para el suministro de ARNm.

Aparte de sistemas de vectores poliméricos y liposómicos, una opción adicional interesante que llegó a ser prominente durante los últimos años es el uso de electroporación. Se han desarrollado protocolos para el suministro de ARN exógeno, dando como resultado una eficiencia de transfección del 50-90 % en células hematopoyéticas humanas y células madre embrionarias humanas. Dado que el ARNm no tiene que entrar en el núcleo, pueden aplicarse suaves pulsos eléctricos, reduciendo la toxicidad celular. Otra ventaja de electroporación puede ser que el ARN se envíe como lanzadera directamente al interior del citosol, no detectándose por tanto posiblemente por receptores de ARN innatos, lo cual puede superar respuestas inmunitarias no deseadas.

Ya se ha mostrado que la aplicación *in vivo* de ADN bacteriano puede conducir a fuertes respuestas inmunitarias, especialmente mediante motivos de CpG no metilados. En contraposición a ADN desnudo, que solo induce una leve respuesta de citocinas, sus complejos con lípidos catiónicos conducen a una fuerte respuesta de citocinas. Mientras que variar las vías de administración de lípidos catiónicos no alteró de manera notable la expresión de citocina inflamatoria, PEI-ADN o bien tras inyección intravenosa o bien suministro por aerosol dio como resultado niveles de citocinas en el pulmón inferiores en comparación con lípidos catiónicos supuestamente debido a su diferente captación endosómica y, por tanto, interacción con el receptor de TLR9.

Las respuestas al suministro de ARN se han explorado mucho menos. Tanto el ADN como el ARN estimulan el sistema inmunitario innato de mamíferos mediante activación de receptores de tipo Toll (TLR). Se han identificado trece TLR (denominados simplemente TLR1 a TLR13) en seres humanos y ratones en conjunto, y se han encontrado formas equivalentes de muchos de ellos en otras especies de mamíferos. De manera notable, diferentes TLR pueden reconocer varios ligandos estructuralmente no relacionados. El sistema inmunitario innato mediado por TLR tiene una arquitectura de pajarita en la que una variedad de patógenos y sus moléculas están representados por un número mucho menor de ligandos. La ubicación subcelular de diferentes TLR se correlaciona en cierto grado con los patrones moleculares de sus ligandos. Por tanto, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9, todos los cuales están implicados en el reconocimiento de estructuras de tipo ácido nucleico, están ubicados de manera intracelular. TLR3 reconoce ARNbc, ARNip y ARNm, mientras que TLR7 y TLR8 se unen a ARNmc y el reconocimiento de motivos de ADN de CpG está mediado a través de TLR9.

En línea con la metilación de CpG de ADN (que suprime el reconocimiento a través de TLR9), la inmunogenicidad del ARN parece estar bajo el control de tipos similares de modificación. El ARN transcripto *in vitro* dio como resultado una fuerte respuesta de TNF-alfa por células dendríticas si no mostraron ninguna modificación típica de mamíferos. De manera enigmática, la modificación de nucleótidos específicos (por ejemplo, N6-metiladenosina o pseudouridina) redujo drásticamente la secreción de citocinas mediada por TLR3, TLR7 y TLR8 y la activación de DC. Por tanto, puede ser posible eliminar las respuestas inmunitarias *in vivo* exageradas introduciendo NTP modificados en la reacción de transcripción *in vitro*. La sustitución de tan solo el 25 % de uridina y citidina por 2-tiouridina y 5-metil-citidina disminuyó de manera sinérgica la unión de ARNm a receptores de reconocimiento de patrones, tales como TLR3, TLR7, TLR8 y RIG-I, en células mononucleares de sangre periférica humanas (PBMC). Estas modificaciones disminuyeron sustancialmente la activación del sistema inmunitario innato *in vitro* e *in vivo* y aumentaron de manera concomitante la estabilidad del ARNm, permitiendo la expresión celular prolongada, a alto nivel, de proteína en >80 % de las células epiteliales de tipo II alveolares humanas y de ratón cultivadas tal como se demuestra mediante citometría de flujo y ELISA de citocinas de sobrenadantes de cultivo celular y sueros de sangre de ratón. Se considera que superar la inmunogenicidad de ARNm intrínseca es crítico para permitir terapias novedosas que requieren una dosificación repetida, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades heredadas y metabólicas o en el campo de la medicina regenerativa.

En contraposición con lo anterior, el fuerte efecto inmunoestimulante del ARN se usa para vacunación terapéutica. Especialmente se seleccionan como diana células dendríticas (DC) como células presentadoras de antígenos (APC) mediante inmunógenos de vacunas, lo cual va seguido por una activación de células T y B específicas de antígeno. Varios estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que seleccionar como diana DC con ARNm indujo inmunidad tumoral o respuestas antitumorales. En comparación con la transfección de ADNp, la transferencia génica basada en ARNm condujo a una carga de antígeno tumoral superior de DC y tuvo un potencial superior para estimular respuestas de linfocitos T citotóxicos. Aparte de enfoques antitumorales, surgió la ambición de usar DC transfectadas con ARN para curar o prevenir enfermedades infecciosas tales como SIDA, hepatitis C o infección fúngica. Otra estrategia elegante para lograr la vacunación con ARN es expresar un antígeno diana mediante un ARN replicante bicistrónico que codifica tanto para el antígeno como para una ARN replicasa, utilizando de ese modo la capacidad de alfavirus para producir grandes cantidades de ARNm viral. Si se transfecta una célula, el ARN viral se amplifica mediante el complejo de replicasa que sintetiza una cadena negativa genómica que representa en sí misma el molde para la síntesis de muchas cadenas positivas de ARN genómico mediante la ARN replicasa. Este enfoque ya se ha usado en un modelo de ratón para romper la tolerancia y proporcionar inmunidad al melanoma.

La presente divulgación ha permitido ahora una manera adecuada de suministrar de manera eficiente ARNm a células pulmonares y permitir una expresión eficaz de la proteína codificada por el ARNm en esas células.

La invención se explica en más detalle en el siguiente ejemplo y las figuras adjuntas, aunque sin restringirse a la misma.

- 5 La figura 1 muestra los resultados de la expresión de EPO medida mediante ELISA en el lisado de pulmón de ratones 24 horas después del tratamiento por aerosol con una combinación que comprende el ARNm de EPO y PEI de 25 kDa (indicado EPO) o el ARNm de EPO químicamente modificado y PEI de 25 kDa (indicado EPO mod) en comparación con ratones sin tratar (sin). Los niveles de EPO aumentan significativamente para ambos grupos de tratamiento en comparación con ratones sin tratar.
- 10 La figura 2 muestra los resultados de la expresión de luciferasa de *Metridia* medida mediante actividad de luminiscencia en el lisado de pulmón de ratones 24 horas después del tratamiento por aerosol con una combinación que comprende ARNm de MetLuc químicamente modificado y PEI de 25 kDa (indicado Met-Luc) o que comprende ARNm de EGFP-Luc químicamente modificado y PEI de 25 kDa (indicado EGFP-Luc) que sirve como control. Los niveles de luciferasa de *Metridia* aumentan significativamente para el grupo de ratones tratados con ARNm de MetLuc químicamente modificado/PEI de 25 kDa en comparación con ratones de control tratados con ARNm de EGFP-Luc químicamente modificado/PEI de 25 kDa.
- 15 La figura 3 muestra que el ARNm de Luc químicamente modificado se expresa de manera eficaz en las células pulmonares de los ratones tras el suministro por aerosol pulmonar como combinación con PEI de 25 kDa (figura 3a+b).
- 20 La figura 4 muestra que la expresión de luciferasa es la más alta para ARNm de Luc químicamente modificado que comprende una caperuza 1.
- 25 La figura 5 muestra que el ARNm de Luc químicamente modificado se expresa de manera eficaz en las células pulmonares de un cerdo tras el suministro por aerosol pulmonar como combinación con PEI de 25 kDa (figura 5B), mientras que no se observa ninguna expresión de Luc en pulmones de animales de control tratados con agua nebulizada (figura 5A).
- 30 La figura 6 muestra que el agua para inyección (WFI) estabiliza ARNm químicamente modificado en formulaciones de PEI; carreles:
- 35 1 - ARNm modificado en agua + heparina
- 40 2 - ARNm modificado en PBS + heparina
- 3 - brPEI de 25 kDa/ARNm modificado pH 7,4 en PBS/agua + heparina (método según Densmore et al., documento EP 1 173 224 B1)
- 45 4 - brPEI de 25 kDa/ARNm modificado pH 7,4 en PBS + heparina (método de Ethris)
- 5 - brPEI de 25 kDa/ARNm modificado pH 7,4 en agua + heparina
- 6 - brPEI de 25 kDa/ARNm modificado pH 6,0 en agua + heparina
- 7 - brPEI de 25 kDa/ARNm modificado pH 5,0 en agua + heparina.

Ejemplos

- 50 1. Aplicación por aerosol *in vivo* de ARNm químicamente modificado y no modificado que codifica para eritropoyetina (EPO) y luciferasa de *Metridia* (metLuc) formulado con polietilenimina (PEI) a los pulmones de ratones

Productos químicos

- 55 Se obtuvo PEI ramificada (MW promedio = 25 kDa) a partir de Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Alemania) y se usó sin purificación adicional. Se diluyó PEI en agua doblemente destilada y se ajustó a pH 7 con HCl. Se adquirió agua libre de endotoxinas doblemente destilada a partir de Delta Pharma (Boehringer Ingelheim, Alemania).

Producción de ARNm

60 Clonación de ADNc de EPO murina (mEPO) en vector pVAXA120

- 65 Se escindió ADNc que codifica para mEPO a partir de plásmido pCR4EPO (adquirido a partir de Open Biosystems, número de catálogo MMM1013-99829153) mediante digestión con *EcoRI* y se clonó en el sitio respectivo de pVAXA120. Se examinaron los clones para determinar el inserto usando digestión con *Pmel* y para determinar la orientación usando *Nhel* (digestión individual) y *Smal-Xba*l (digestión doble). Los clones que eran correctos con las

tres digestiones se usaron para la producción de ARN.

Producción de ARNm de mEPO

- 5 Para generar un molde para la transcripción *in vitro*, se linealizó plásmido en el sentido de 3' de la cola de poli(A) mediante digestión durante la noche con *Xba*I (Fermentas) a 37 °C y se purificó usando extracción con cloroformo y precipitación con acetato de sodio tal como se describe por Sambrook *et al.* (Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T (1989). En Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. vol. 1, 2, 3). Se confirmó la linealización completa de molde de plásmido en gel de agarosa al 1 %.
- 10 Se llevó a cabo la transcripción *in vitro* de pVAXA120-mEPO con el sistema de producción de ARN a gran escala RiboMAX - T7 (Promega, Alemania) a 30 y 37 °C siguiendo el protocolo del fabricante usando el análogo de caperuza anti-inverso (ARCA; P1-(5'-(3'-o-metil)-7-metil-guanosil)P3-(5'-(guanosil))trifosfato, sal de sodio, Jena Biosciences, Alemania). Para la transcripción *in vitro* de ARNm de mEPO químicamente modificado (EPO Mod) se sustituyó el 25 % tanto de citidina-5'-trifosfato como de uridina-5'-trifosfato por 5-metilcitidina-5'-trifosfato (TriLink, EE. UU.) y 2-tiouridina-5'-trifosfato (TriLink, EE. UU.). Se realizó la purificación de ARNm mediante extracción con cloroformo y cromatografía de exclusión molecular en columnas PD-10 (GE Healthcare, Alemania). Se examinó el ARNm producido para determinar la actividad mediante transfección de una línea de células epiteliales bronquiales (BEAS-2B) y una línea de células de riñón epiteliales embrionarias humanas (HEK 293) y medición de cantidades de mEPO mediante ELISA (R&D Systems, Alemania). Pudieron cuantificarse cantidades significativamente superiores de mEPO a partir de BEAS-2B transfectadas con ARNm de mEPO producido a 30 °C en comparación con su homólogo producido a 37 °C.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45

Clonación de ORF de luciferasa de *Metridia* (MetLuc) en vector pVAXA120

- 25 Se sintetizó ORF que codificaba para MetLuc (secuencia de Clonetech) y se clonó en sitios de *Bam*H I / *Eco*RI de pVAXA120 mediante GeneArt AG (Alemania). Se usó adicionalmente el plásmido pVAXA120-MetLuc recibido para transcripción *in vitro*.

Producción de ARNm de MetLuc químicamente modificado

- 30 Para generar un molde para la transcripción *in vitro*, se linealizó plásmido en el sentido de 3' de la cola de poli(A) mediante digestión durante la noche con *Xba*I (Fermentas) a 37 °C y se purificó usando extracción con cloroformo y precipitación con acetato de sodio tal como se describe por Sambrook *et al.* (Sambrook, J., Fritsch, E. F., y Maniatis, T (1989). En Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y. vol. 1, 2, 3). Se confirmó la linealización completa de molde de plásmido en gel de agarosa al 1 %.

- 35 Se llevó a cabo la transcripción *in vitro* de pVAXA120-MetLuc con el sistema de producción de ARN a gran escala RiboMAX - T7 (Promega, Alemania) a 30 °C siguiendo el protocolo del fabricante usando el análogo de caperuza anti-inverso (ARCA; P1-(5'-(3'-o-metil)-7-metil-guanosil)P3-(5'-(guanosil))trifosfato, sal de sodio, Jena Biosciences, Alemania). Para la transcripción *in vitro* de ARNm de MetLuc químicamente modificado se sustituyó el 25 % tanto de citidina-5'-trifosfato como de uridina-5'-trifosfato por 5-metilcitidina-5'-trifosfato (TriLink, EE. UU.) y 2-tiouridina-5'-trifosfato (TriLink, EE. UU.). Se realizó la purificación de ARNm mediante extracción con cloroformo y cromatografía de exclusión molecular en columnas PD-10 (GE Healthcare, Alemania). Se examinó el ARNm producido para determinar la actividad mediante transfección de una línea celular de fibroblastos murina (NIH-3T3) y medición de actividad de MetLuc usando un ensayo indicador de luciferasa de *Metridia*.

Animales

- 50 Se obtuvieron ratones BALB/c hembra de seis a ocho semanas de edad a partir de Janvier, Route Des Chênes SecsBP5, F-53940 Le Genest St. Isle, Francia, y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos. Se aclimataron los ratones al entorno de la instalación para animales durante al menos siete días antes de los experimentos. Todos los procedimientos con animales los aprobó y controló el comité ético local y se llevaron a cabo según las directrices de la legislación alemana sobre protección de la vida animal.
- 55

Preparación de polipleyos de PEI-ARNm

- 60 Se formularon polipleyos de la siguiente manera: se diluyeron ARNm y PEI en 4,0 ml de agua doblemente destilada dando como resultado concentraciones de ARNm 250 µg/ml y PEI 326,3 µg/ml, respectivamente (correspondientes a una razón de N/P de 10). Se añadió con pipeta la disolución de ARNm a la disolución de PEI, se mezclaron cargando y descargando con la pipeta, para proporcionar una concentración de ARNm final de 125 µg/ml. Se incubaron los complejos durante 20 min a temperatura ambiental antes de su uso. Dentro del transcurso de la presente invención se observó que resulta específicamente ventajoso usar solo agua sin ningún tampón para la complejación porque de lo contrario pueden agregarse nanopartículas o resultar ineficaz en pulmones de ratón (Rudolph *et al.*, J. Mol Ther. 2005, 12: 493-501)
- 65

Diseño de los dispositivos de aerosol

Para el procedimiento de nebulización en un dispositivo de cuerpo completo, se colocan ratones en una caja de plástico de $9,8 \times 13,2 \times 21,5$ cm que puede sellarse con una tapa. En un lado estrecho de la caja, están posicionados cuatro pequeños orificios como flujo de salida de aerosol. A través de un orificio en el lado estrecho opuesto, la caja está conectada mediante una pieza de conexión de 2,1 cm de diámetro a un cilindro de plástico de 15,4 cm de anchura \times 41,5 cm de longitud. La parte inferior del cilindro está cubierta de manera uniforme con 150 g de gel de sílice (1-3 mm, n.º 85330; Fluka, Suiza) para secar el aerosol que se produce mediante un nebulizador de chorro nebulizador de chorro (PARI BOY® LC plus, PARI GmbH) conectado al otro extremo del cilindro. (Detalles descritos en Rudolph *et al.*, J Gene Med. 2005, 7: 59-66).

Medición de actividad de EPO y MetLuc en los homogeneizados de pulmón

Veinticuatro horas tras la administración se anestesiaron los ratones mediante inyección intraperitoneal de medetomidina (11,5 µg/kg de P.C.), midazolam (115 µg/kg de P.C.) y fentanilo (1,15 µg/kg de P.C.) y se abrieron los peritoneos mediante incisiones en la línea media. Después de abrir los peritoneos mediante incisiones en la línea media, se disecaron los pulmones a partir de los animales y se sometieron a perfusión con PBS. Se congelaron instantáneamente los pulmones en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en estado congelado con mortero y mano de almirez. Tras la adición de 400 µl de tampón de lisis que contenía Tris 25 mM pH 7,4, Triton X-100 al 0,1 % e inhibidor de proteasa completo (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Alemania), se incubaron las muestras durante 20 min en hielo. Posteriormente se centrifugaron los lisados de proteína a 10.000 rcf, 5 min. Se midió la actividad de EPO en el sobrenadante mediante ELISA (R&D Biosystems) y se analizó la actividad de MetLuc mediante la medición de actividad de luminiscencia tras la adición de coelenterazina tal como se describe por Höning *et al.*, Biomacromolecules 2010, 11: 1802-1809).

Resultados:

El primer experimento muestra que el ARNm de EPO tanto no modificado como químicamente modificado se expresa de manera eficaz en las células pulmonares de los animales tras el suministro por aerosol pulmonar como combinación con PEI de 25 kDa. Esto muestra que el método para suministro en los pulmones es independiente de la composición química de ARNm. El segundo experimento muestra que la luciferasa de *Metridia* se expresa de manera eficaz en las células pulmonares de los animales tras el suministro por aerosol pulmonar como combinación con PEI de 25 kDa. Esto muestra que el método de suministro en los pulmones no está restringido a un único ARNm codificante, sino que es independiente de la secuencia para la que codifica el ARNm. En conjunto, esto muestra que el objetivo de la presente invención puede abordarse de manera apropiada mediante el método y las preparaciones farmacéuticas según la presente invención.

2. Aplicación por aerosol *in vivo* de ARNm químicamente modificado que codifica para luciferasa de luciérnaga (Luc) formulado con polietilenimina (PEI) a los pulmones de ratones

Productos químicos

Se obtuvo PEI ramificada (MW promedio = 25 kDa) a partir de Sigma-Aldrich (Schnelldorf, Alemania) y se usó sin purificación adicional. Se diluyó PEI en agua para inyección y se ajustó a pH 7,4 con HCl. Se adquirió agua libre de endotoxinas a partir de B. Braun (Melsungen, Alemania).

Producción de ARNm de Luc químicamente modificado

Para generar un molde para la transcripción *in vitro* (IVT) se linealizó el plásmido pVAXA120-Luc mediante digestión de restricción con NotI. Se purificó adicionalmente el molde mediante precipitación con cloroformo-etanol. Se determinó la calidad del molde mediante electroforesis en gel de agarosa nativa. Se llevó a cabo la IVT con una mezcla de IVT patrón que contenía trifosfatos de ribonucleótidos, un análogo de caperuza anti-inverso (ARCA, m^{7,3'}GpppG) y ARN polimerasa de T7. Se introdujeron modificaciones usando el 25 % de 5-metil-citidina-5'-trifosfato y el 25 % de 2-tio-uridina-5'-trifosfato. Se usó ARCA para garantizar la incorporación de caperuza únicamente en la orientación deseada. Para generar ARNm que contenía la estructura de caperuza 0 o caperuza 1 usando un procedimiento de introducción de caperuza posterior, se realizó IVT sin ningún análogo de caperuza dando como resultado ARNm que contenía un trifosfato 5'-terminal. Se realizó la introducción de caperuza usando la enzima de introducción de caperuza del virus vaccinia, rGTP y S-adenosil-metionina (SAM) como donador de metilo para añadir una estructura de caperuza 0 de 7-metilguanilato (m⁷GpppG) en el extremo 5' del ARNm. Para añadir un grupo metilo en la posición 2'-O del primer nucleótido adyacente a la estructura de caperuza 0 en el extremo 5' del ARNm resultante de la introducción de caperuza posterior, se usaron una ARNm caperuza 2'-o-metiltransferasa y SAM. Esta metilación dio como resultado una estructura de caperuza 1 (m⁷GpppGm) de la caperuza de ARNm. Se realizó la purificación de ARNm mediante precipitación con acetato de amonio. Se resuspendió ARN de Luc modificado en agua para inyección y se realizó un control de calidad usando medición de UV, electroforesis en gel de agarosa nativa y transfección en células NIH3T3.

Animales

Se obtuvieron ratones BALB/c hembra de seis a ocho semanas de edad a partir de Janvier, Route Des Chênes SecsBP5, F-53940 Le Genest St. Isle, Francia, y se mantuvieron en condiciones libres de patógenos específicos. Se acclimataron los ratones al entorno de la instalación para animales durante al menos siete días antes de los experimentos. Todos los procedimientos con animales los aprobó y controló el comité ético local y se llevaron a cabo según las directrices de la legislación alemana sobre protección de la vida animal.

Preparación de poliplejos de PEI-ARNm

- 10 Se formularon poliplejos de la siguiente manera: se diluyeron ARNm y PEI en 4,0 ml en agua doblemente destilada dando como resultado concentraciones de ARNm 250 µg/ml y PEI 326,3 µg/ml, respectivamente (correspondientes a una razón de N/P de 10). Se añadió con pipeta la disolución de ARNm a la disolución de PEI, se mezclaron cargando y descargando con la pipeta, para proporcionar una concentración de ARNm final de 125 µg/ml. Se incubaron los complejos durante 20 min a temperatura ambiental antes de su uso. Dentro del transcurso de la presente invención se observó que resulta específicamente ventajoso usar solo agua sin ningún tampón para la complejación porque de lo contrario pueden agregarse nanopartículas o resultar ineficaces en pulmones de ratón (Rudolph *et al.*, J. Mol Ther. 2005, 12: 493-501)

Diseño de los dispositivos de aerosol

- 20 Para el procedimiento de nebulización en un dispositivo de cuerpo completo, se colocan ratones en una caja de plástico de 9,8 × 13,2 × 21,5 cm que puede sellarse con una tapa. En un lado estrecho de la caja, están posicionados cuatro pequeños orificios como flujo de salida de aerosol. A través de un orificio en el lado estrecho opuesto, la caja está conectada mediante una pieza de conexión de 2,1 cm de diámetro a un cilindro de plástico de 15,4 cm de anchura × 41,5 cm de longitud. La parte inferior del cilindro está cubierta de manera uniforme con 150 g de gel de sílice (1-3 mm, n.º 85330; Fluka, Suiza) para secar el aerosol que se produce mediante un nebulizador de chorro (PARI BOY® LC plus, PARI GmbH) conectado al otro extremo del cilindro. (Detalles descritos en Rudolph *et al.*, J Gene Med. 2005, 7: 59-66).

30 Medición de actividad de Luc en pulmones de ratón usando obtención de imágenes bioluminiscentes *in vivo*

- Veinticuatro horas tras la administración, se anestesiaron los ratones mediante inyección intraperitoneal de medetomidina (11,5 µg/kg de P.C.), midazolam (115 µg/kg de P.C.) y fentanilo (1,15 µg/kg de P.C.). Se aplicó sustrato de D-luciferina (3 mg/50 µl de PBS por ratón) mediante vía intranasal (Buckley SM, Howe SJ, Wong SP, Buning H, McIntosh J, *et al.* (2008) Luciferin detection after intra-nasal vector delivery is improved by intra-nasal rather than intraperitoneal luciferin administration. Hum Gene Ther). Se midió la bioluminiscencia 10 minutos después, usando un sistema de obtención de imágenes IVIS 100 (Xenogen, Alameda, EE. UU.) y los ajustes de cámara: campo de visión 10, abertura relativa f1, agrupamiento de alta resolución y tiempo de exposición de 10 min. Se cuantificó la señal y se analizó usando el software Living Image versión 2.50 (Xenogen, Alameda, EE. UU.).

40 Resultados:

- El experimento muestra que el ARNm de Luc químicamente modificado se expresa de manera eficaz en las células pulmonares de los ratones tras el suministro por aerosol pulmonar como combinación con PEI de 25 kDa (figura 3).
45 La expresión de luciferasa es la más alta para ARNm de Luc químicamente modificado que comprende una caperuza 1 (figura 4). En conjunto, esto muestra que el objetivo de la presente invención puede abordarse de manera apropiada mediante el método y las preparaciones farmacéuticas según la presente invención.

50 3. Aplicación por aerosol *in vivo* de ARNm químicamente modificado que codifica para luciferasa de luciérnaga (Luc) formulado con polietilenimina (PEI) a los pulmones de cerdo

Productos químicos

Véase el ejemplo 2 anterior

55 Producción de ARNm de Luc químicamente modificado

Véase el ejemplo 2 anterior

60 Procedimiento experimental

- Se inició la sedación del cerdo mediante medicación previa con azaperona 2 mg/kg de peso corporal, ketamina 15 mg/kg de peso corporal, atropina 0,1 mg/kg de peso corporal y seguido por inserción de una línea intravenosa en la vena auricular lateral. Se anestesió al cerdo mediante inyección intravenosa de propofol 3-5 mg/kg de peso corporal según se requirió. Se mantuvo la anestesia con infusión intravenosa continua de propofol al 1 % según se requirió. Los parámetros de ventilación coincidieron con el dióxido de carbono al final de la inspiración y se ajustó si era

necesario. Se monitorizaron continuamente los parámetros de anestesia, respiratorios y cardiovasculares usando pulsioximetría, capnografía, sonda de temperatura rectal y estado de reflejos. El cerdo recibió infusión de disolución de electrolitos equilibrada a 10 ml/kg/h. La duración de la anestesia fue de aproximadamente 80-120 min. Se sacrificó al cerdo con una inyección en bolo de pentobarbital 100 mg/kg de peso corporal mediante la vena de la oreja lateral 5 tras la sedación después de completarse la aplicación por aerosol (nebulizador de malla Aeroneb). Se escindieron los pulmones y se realizaron cortes de muestras de tejido de aproximadamente 1 cm de grosor que se recogieron de diversas regiones del pulmón seguido por incubación en medio de cultivo celular durante 24 h a 37 °C (dióxido de carbono al 5 %) en una incubadora. Para la medición de la actividad de luciferasa se incubaron muestras de tejido en 10 un baño de medio que comprendía sustrato de D-luciferina en PBS (100 µg/ml) a 37 °C durante 30 min y se sometieron a obtención de imágenes bioluminiscentes de luciferasa ex vivo (IVIS 100, Xenogen, Alameda, EE. UU.).

Preparación de polipleyos de PEI-ARNm

Se formaron polipleyos usando una bomba de jeringa de dos canales (KDS-210-CE, KD Scientific). Se diluyeron ARNm 15 y PEI cada uno en 12,0 ml de agua doblemente destilada dando como resultado concentraciones de ARNm 500 µg/ml y PEI 650 µg/ml, respectivamente (correspondientes a una razón de N/P de 10). Se llenaron ambas disoluciones en una jeringa de 20 ml independiente usando la función de extracción de la bomba de jeringa a una velocidad de 5 ml/min. Para mezclar ambas muestras, se conectaron las dos jeringas mediante un tubo (conjunto de extensión Safeflow, B. Braun) a una pieza en T. La mezcla se realizó usando la función de infusión de la bomba de jeringa a una velocidad de 40 ml/min. Se incubaron los complejos durante 30 min a temperatura ambiente antes de su uso. Dentro 20 del transcurso de la presente invención se observó que resulta específicamente ventajoso usar solo agua sin ningún tampón para la complejación porque de lo contrario pueden agregarse nanopartículas o resultar ineficaces en pulmones de ratón (Rudolph *et al.*, J. Mol Ther. 2005, 12: 493-501).

25 **Resultados:**

El experimento muestra que el ARNm de Luc químicamente modificado se expresa de manera eficaz en las células pulmonares de un cerdo tras el suministro por aerosol pulmonar como combinación con PEI de 25 kDa (figura 5B), mientras que no se observa ninguna expresión de Luc en pulmones de animales de control tratados con agua 30 nebulizada (figura 5A). En conjunto, esto muestra que el objetivo de la presente invención puede abordarse de manera apropiada mediante el método y las preparaciones farmacéuticas según la presente invención.

4. El agua para inyección (WFI) estabiliza ARNm químicamente modificado en formulaciones de PEI

35 El efecto de agua para inyección en comparación con PBS sobre la estabilidad de ARNm se examinó mediante electroforesis en gel de agarosa (figura 6). Mientras que ARNm complejado con PEI en PBS conduce a la degradación de ARNm ya después de 4 h de incubación a temperatura ambiente tal como se indica mediante una mancha de productos de ARNm degradado, las formulaciones de PEI/ARNm en WFI se estabilizaron notablemente tal como se indica mediante menos productos de degradación de ARNm (figura 5) y una mayor intensidad de banda del producto 40 de ARNm principal. Este efecto es más pronunciado para un ARNm grande tal como ARNm de CFTR que para un ARNm de Luc más corto y se vuelve incluso más evidente después de la incubación a temperatura ambiente durante 24 h. De manera importante, la degradación de ARNm disminuye con la disminución del pH y alcanza un mínimo a pH=5. Esta observación explica las propiedades más favorables y la necesidad de usar WFI para el suministro de ARNm por aerosol en formulación de PEI porque el WFI tiene habitualmente un pH ácido a valores de pH=5 y, por tanto, estabiliza de manera inherente el ARNm frente a la degradación en una formulación de PEI acuosa. 45

Procedimiento experimental

50 Preparación de polipleyos de ARNm-PEI. Se prepararon disoluciones madre de PEI ramificada de 25 kDa (Sigma-Aldrich, Schnelldorf) a 10 mg/ml y 5 mg/ml o bien en agua para inyección (WFI, B. Braun, Melsungen) o bien en PBS de Dulbecco (Life technologies, Darmstadt) y se ajustó el pH con HCl a pH 7,4, pH 6,0 o pH 5,0.

55 Se diluyeron 25 µl de ARNm modificado (1 µg/µl) y 3,3 µl de disolución madre de PEI (10 mg/ml) en 50 µl de WFI o D-PBS dando como resultado concentraciones de ARNm 0,5 µg/µl y PEI 0,66 µg/µl, respectivamente (correspondientes a una razón de N/P de 10). Según la patente (documento EP 1173224 B1), se diluyeron 25 µl de ARNm modificado (1 µg/µl) y 6,6 µl de disolución madre de PEI en D-PBS (5 mg/ml) en 50 µl de WFI. Se agitó lentamente la disolución de PEI con vórtex y se añadió la disolución de ADN a la misma para obtener un volumen final de 100 µl. Se dejó reposar la mezcla a temperatura ambiente durante 20 min antes de su uso.

60 Para el ensayo de liberación usando electroforesis en gel de agarosa nativa, se añadió 1 µl de disolución de poliplojo a 4 µl de una disolución de heparina (40 mg/ml en WFI). Se incubó la mezcla a temperatura ambiente durante 10 min. Tras la incubación, se añadieron 5 µl de tinte de carga de ARN 2X (Thermo Fisher) y se incubaron las muestras a 70 °C durante 10 min. Posteriormente, se colocaron las muestras en hielo durante 2 min y después se cargaron sobre gel de agarosa al 1 %. Se hizo pasar el gel a 180 V durante el 1-1,5 h y se visualizó usando el sistema de documentación 65 de gel Intas.

REIVINDICACIONES

1. ARNm que está complejado con polietilenimina (PEI) para proporcionar una combinación que comprende el ARNm y PEI para su uso en el tratamiento de un defecto pulmonar mediante expresión del ARNm en el pulmón, en el que
- 5 - la combinación que comprende el ARNm y PEI va a administrarse al pulmón en el que entra en células pulmonares; y
- 10 - el ARNm va a expresarse en las células pulmonares,
- en el que el ARNm codifica para regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), proteína tensioactiva B (SPB), miembro 3 de la subfamilia A de casete de unión a ATP (ABCA3) o alfa-1 antitripsina (A1AT), proteína tensioactiva C (SPC), eritropoyetina, factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, hepcidina, enzima II convertidora de la angiotensina o antígenos de patógenos virales o bacterianos, y
- 15 en el que dicha combinación va a administrarse al pulmón por inhalación mediante un nebulizador, va a introducirse en las vías respiratorias mediante un nebulizador, se formula para su inhalación mediante un nebulizador y/o se formula para su introducción en las vías respiratorias mediante un nebulizador.
- 20
2. ARNm para su uso según la reivindicación 1, en el que el pulmón es el pulmón de un paciente humano, preferiblemente un paciente humano con un defecto pulmonar.
- 25 3. ARNm para su uso según la reivindicación 1 o 2, en el que la combinación que comprende el ARNm y PEI va a administrarse al pulmón por vía intratraqueal.
4. Composición farmacéutica que comprende ARNm complejado con PEI para su uso en el tratamiento de un defecto pulmonar mediante expresión del ARNm en el pulmón,
- 30 en la que el ARNm codifica para regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), proteína tensioactiva B (SPB), miembro 3 de la subfamilia A de casete de unión a ATP (ABCA3) o alfa-1 antitripsina (A1AT), proteína tensioactiva C (SPC), eritropoyetina, factor de estimulación de colonias de granulocitos-macrófagos, hepcidina, enzima II convertidora de la angiotensina o antígenos de patógenos virales o bacterianos, y
- 35 en la que dicha composición farmacéutica va a administrarse al pulmón por inhalación mediante un nebulizador, va a introducirse en las vías respiratorias mediante un nebulizador, se formula para su inhalación mediante un nebulizador y/o se formula para su introducción en las vías respiratorias mediante un nebulizador.
- 40
5. ARNm para su uso o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en los que dicho defecto pulmonar se selecciona del grupo de deficiencia de proteína tensioactiva B (SPB), deficiencia de miembro 3 de la subfamilia A de casete de unión a ATP (ABCA3), fibrosis quística, deficiencia de alfa-1 antitripsina (A1AT), cáncer de pulmón, deficiencia de proteína tensioactiva C (SPC), proteinosis alveolar, sarcoidosis, bronquitis aguda y crónica, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), asma bronquial, bronquiectasia, neumoconiosis, asbestosis, síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), síndrome de dificultad respiratoria neonatal (SDRN), edema pulmonar, eosinofilia pulmonar, neumonía de Löffler, síndrome de Hamman-Rich, fibrosis pulmonar idiopática, enfermedades pulmonares intersticiales, discinesia ciliar primaria, hipertensión arterial pulmonar (HAP) y deficiencia de STAT5b, defectos del complemento, especialmente deficiencia de proteína C, púrpura trombocitopénica trombótica y hemocromatosis congénita, especialmente deficiencia de hepcidina; enfermedades infecciosas pulmonares, preferiblemente infección por virus sincitial respiratorio (VSR), infección por virus parainfluenza (VPI), infección por virus influenza, infección por rinovirus y síndrome respiratorio agudo grave (infección por coronavirus (SARS-CoV), tuberculosis, infección por *Pseudomonas aeruginosa*, infección por *Burkholderia cepacia*, infección por *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA) e infección por *Haemophilus influenzae*.
- 45
6. ARNm para su uso o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en los que la PEI tiene un peso molecular de 1 kDa a 1000 kDa, preferiblemente desde 10 kDa hasta 50 kDa, especialmente desde 20 hasta 30 kDa.
- 50
7. ARNm para su uso o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en los que dicha combinación o composición farmacéutica no comprende un ligando de direccionamiento, preferiblemente un ligando de receptor de IP₁, más preferiblemente un análogo de prostaciclina, especialmente iloprost (ácido 5-((E)-(1S,5S,6R,7R)-7-hidroxi-6[(E)-(3S,4RS)-3-hidroxi-4-metil-1-octen-6-inil]-
- 55
- 60
- 65

bi-ciclo[3.3.0]octan-3-iliden}pentanoico) o treprostinilo (ácido (1R,2R,3aS,9aS)-[[2,3,3a,4,9,9a-hexahidro-2-hidroxi-1-[(3S)-3-hidroxiocil]-1H-benz[f]inden-5-il]oxi]acético).

- 5 8. ARNm para su uso o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 7, en los que dicho ligando de direccionamiento es para el suministro específico de diana de una formulación farmacéutica basada en PEI a células pulmonares.
- 10 9. ARNm para su uso o composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 8, en los que dicho suministro específico de diana es a células epiteliales bronquiales o alveolares.
- 15 10. ARNm para su uso o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en los que la PEI no comprende el ligando de direccionamiento como se define en cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.
- 20 11. ARNm para su uso o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en los que dicha combinación o composición farmacéutica consiste en
 - (i) dicho ARNm complejado con PEI;
 - (ii) dicho ARNm complejado con PEI y
 - (A) agua destilada;
 - (B) agua farmacéuticamente aceptable/agua para inyección (WFI);
 - (C) agua ultrapura esterilizada en autoclave; o
 - (D) agua corriente; o
 - (iii) (i) o (ii) y un(os) portador(es) farmacéuticamente aceptable(s) y/o un(os) compuesto(s) auxiliar(es) adicional(es).
- 25 12. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 11, en la que PEI está acoplada a partículas magnéticas y/o en la que la composición farmacéutica es un aerosol que contiene partículas magnéticas.
- 30 13. Composición farmacéutica para su uso según la reivindicación 12, en la que las partículas magnéticas tienen un diámetro de al menos 5 nm y como máximo 800 nm.
- 35 14. Preparación farmacéutica para su uso según la reivindicación 12 o 13, en la que las partículas magnéticas tienen un diámetro de al menos 50 nm y como máximo 750 nm, preferiblemente de al menos 100 nm y como máximo 700 nm, más preferiblemente de al menos 150 nm y como máximo 600 nm, todavía más preferiblemente de al menos 200 nm y como máximo 500 nm, de manera particularmente preferible de al menos 250 nm y como máximo 450 nm, lo más preferiblemente de al menos 300 nm y como máximo 400 nm.
- 40 15. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 14, en la que las partículas magnéticas consisten en metales y/u óxidos y/o hidróxidos de los mismos o contienen metales y/u óxidos y/o hidróxidos de los mismos, preferiblemente en la que los metales se seleccionan del grupo que consiste en hierro, cobalto o níquel; y los óxidos o hidróxidos se seleccionan del grupo que consiste en Fe_3O_4 , gamma- Fe_2O_3 , óxidos o hidróxidos dobles de iones de hierro di o trivalentes con CO^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Cr^{3+} , Gd^{3+} , Dy^{3+} o Sm^{3+} , y cualquier mezcla de los mismos.
- 45 16. Composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 4 a 15, en la que la composición tiene un pH de menos de 6,5, preferiblemente de 3 a 6, especialmente de 4 a 5,5; y/o en la que la composición tiene una conductividad a 25 °C de 10000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ o inferior, preferiblemente de 1000 $\mu\text{S}/\text{cm}$ o inferior, especialmente de 100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ o inferior.
- 50 17. ARNm para su uso o composición farmacéutica para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en los que dicha combinación o composición farmacéutica se formula como un líquido o polvo para su nebulización.

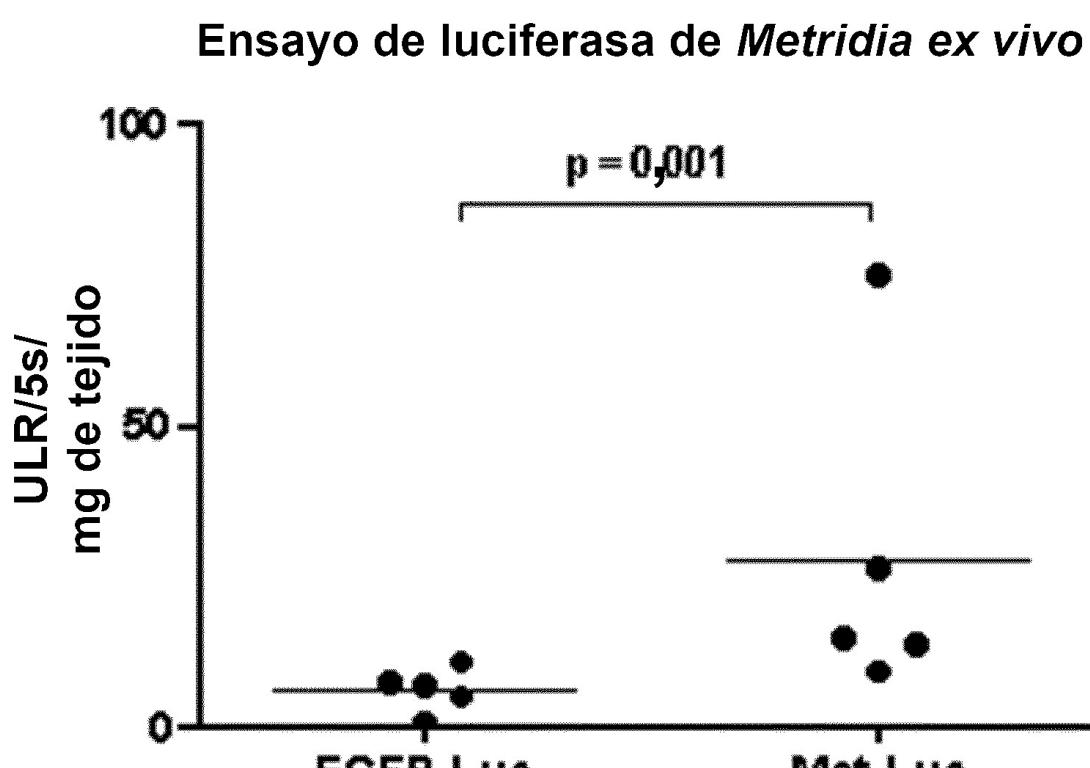
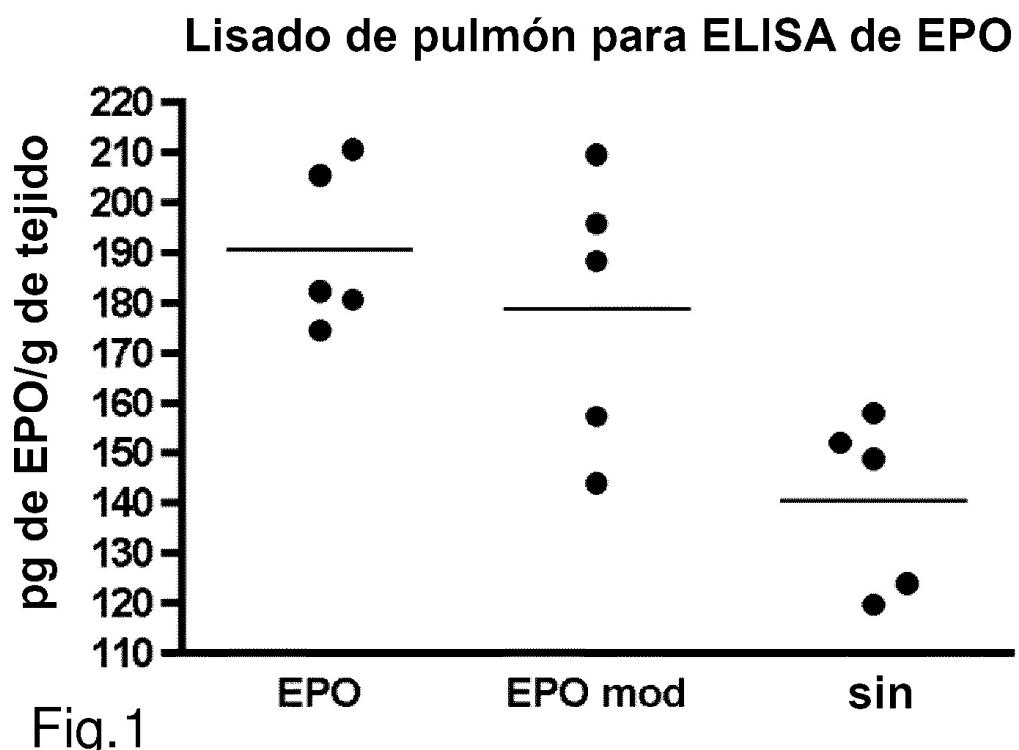


Fig.2

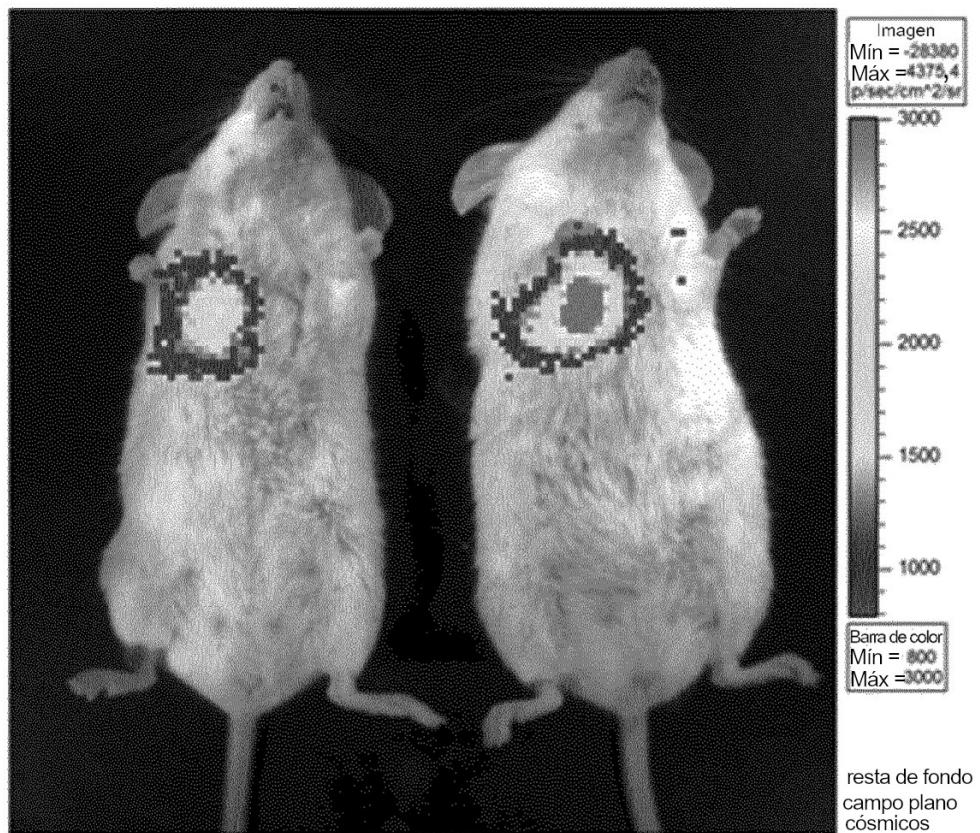


Fig.3a

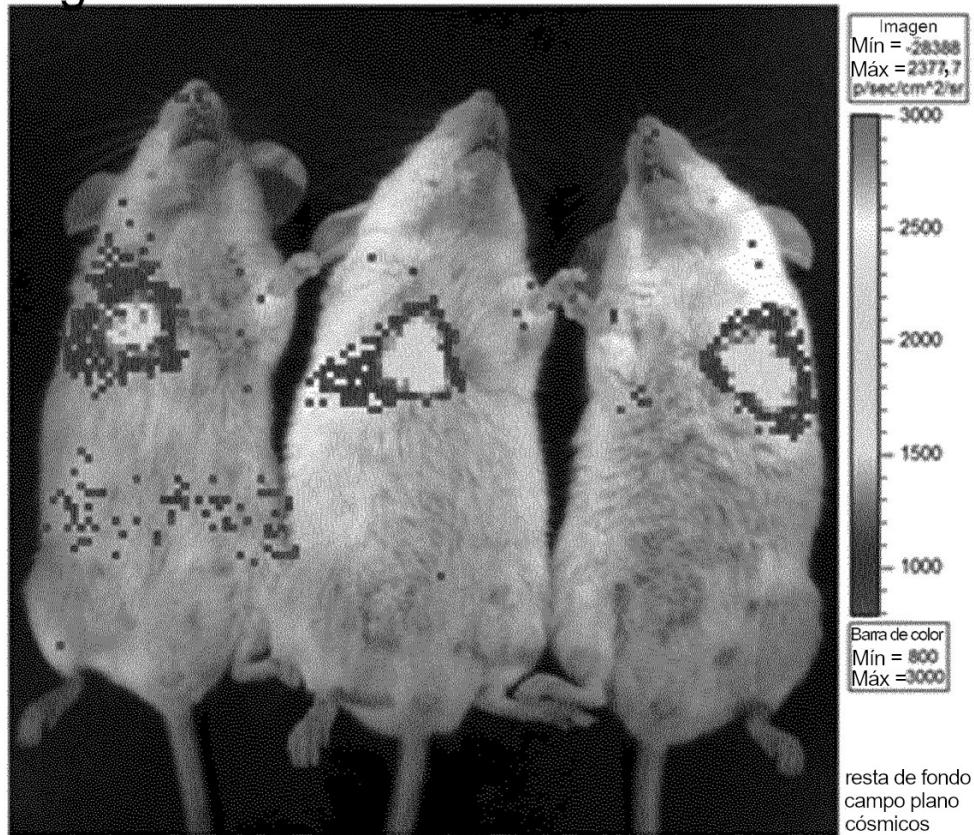


Fig.3b

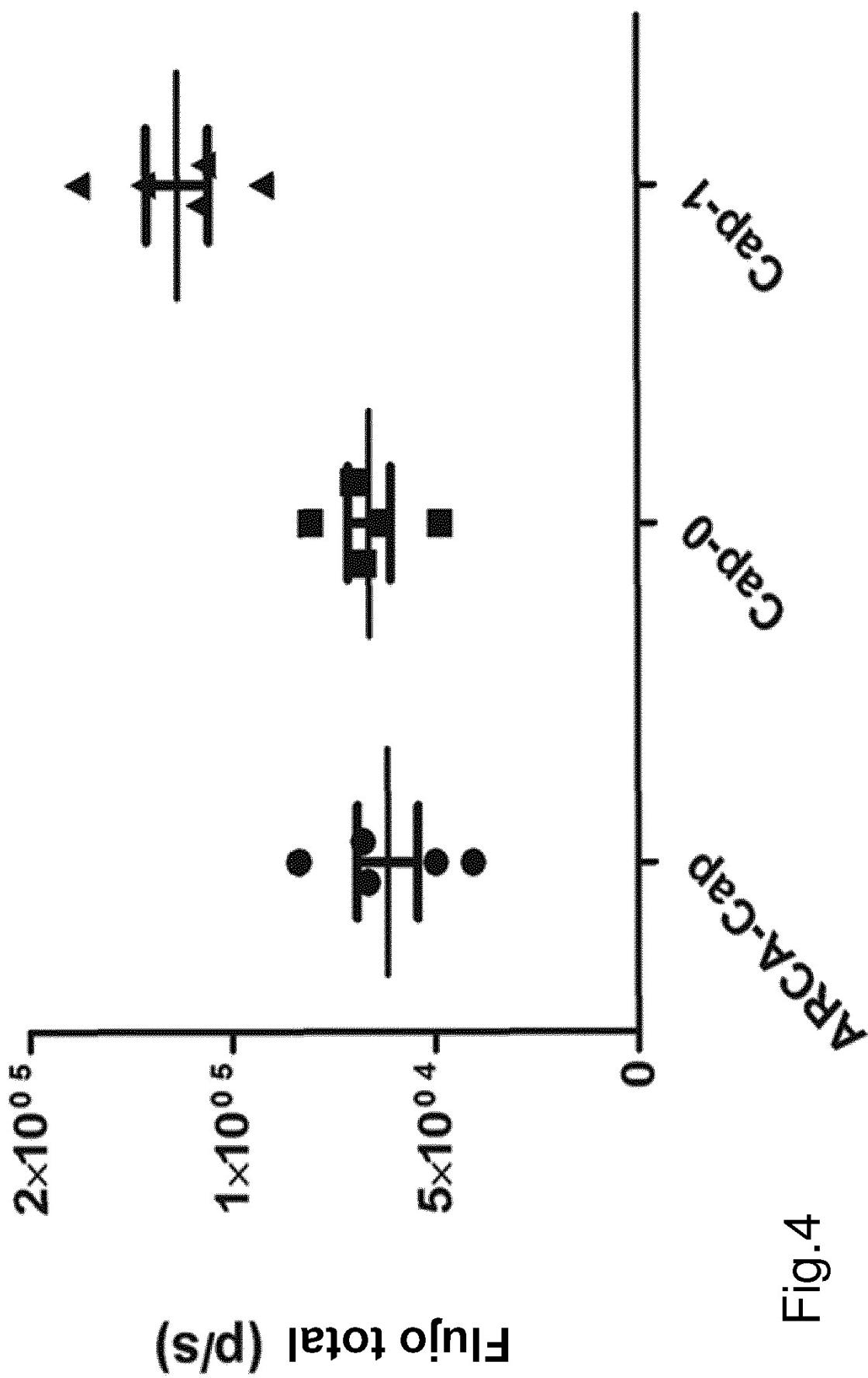


Fig.5a

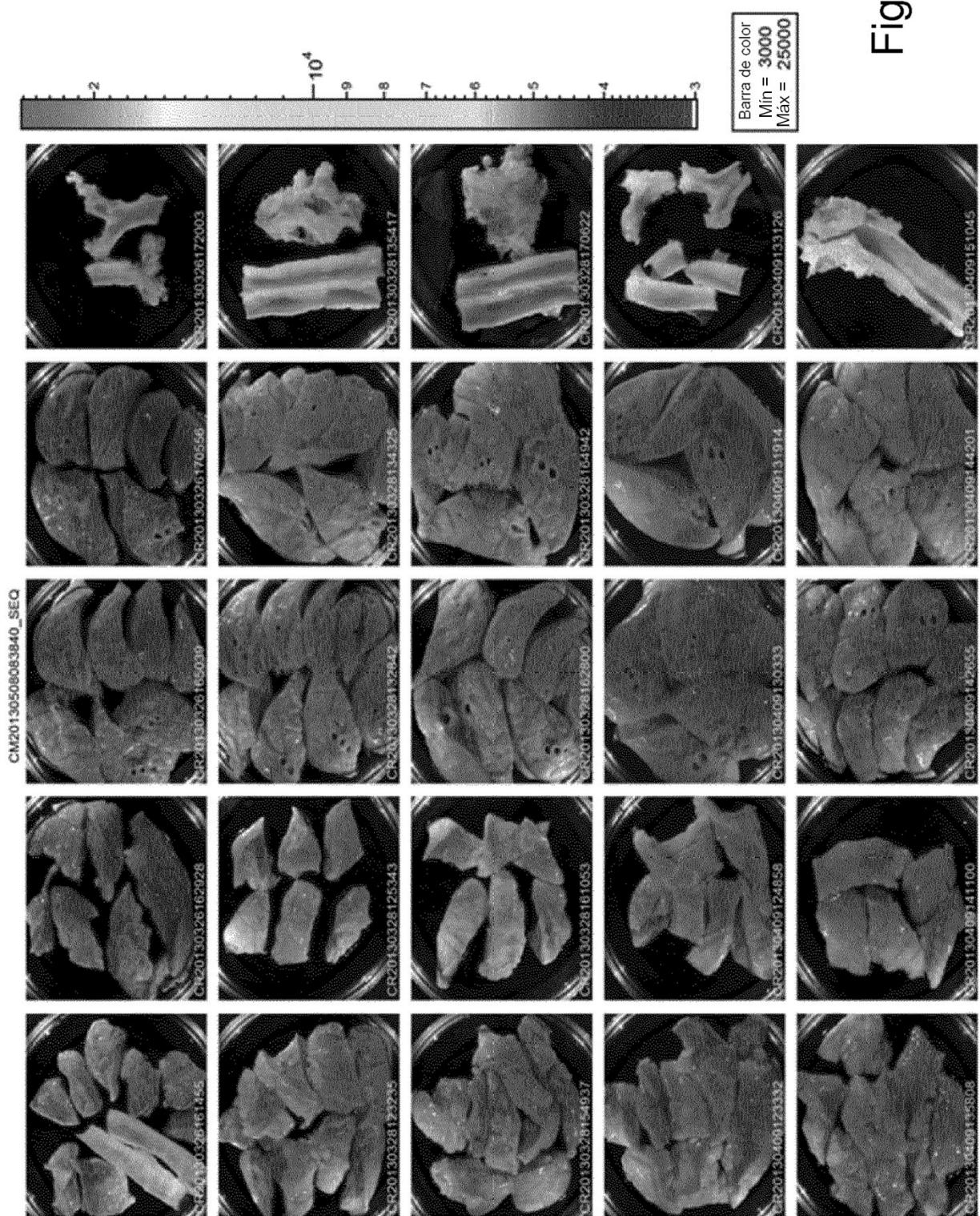
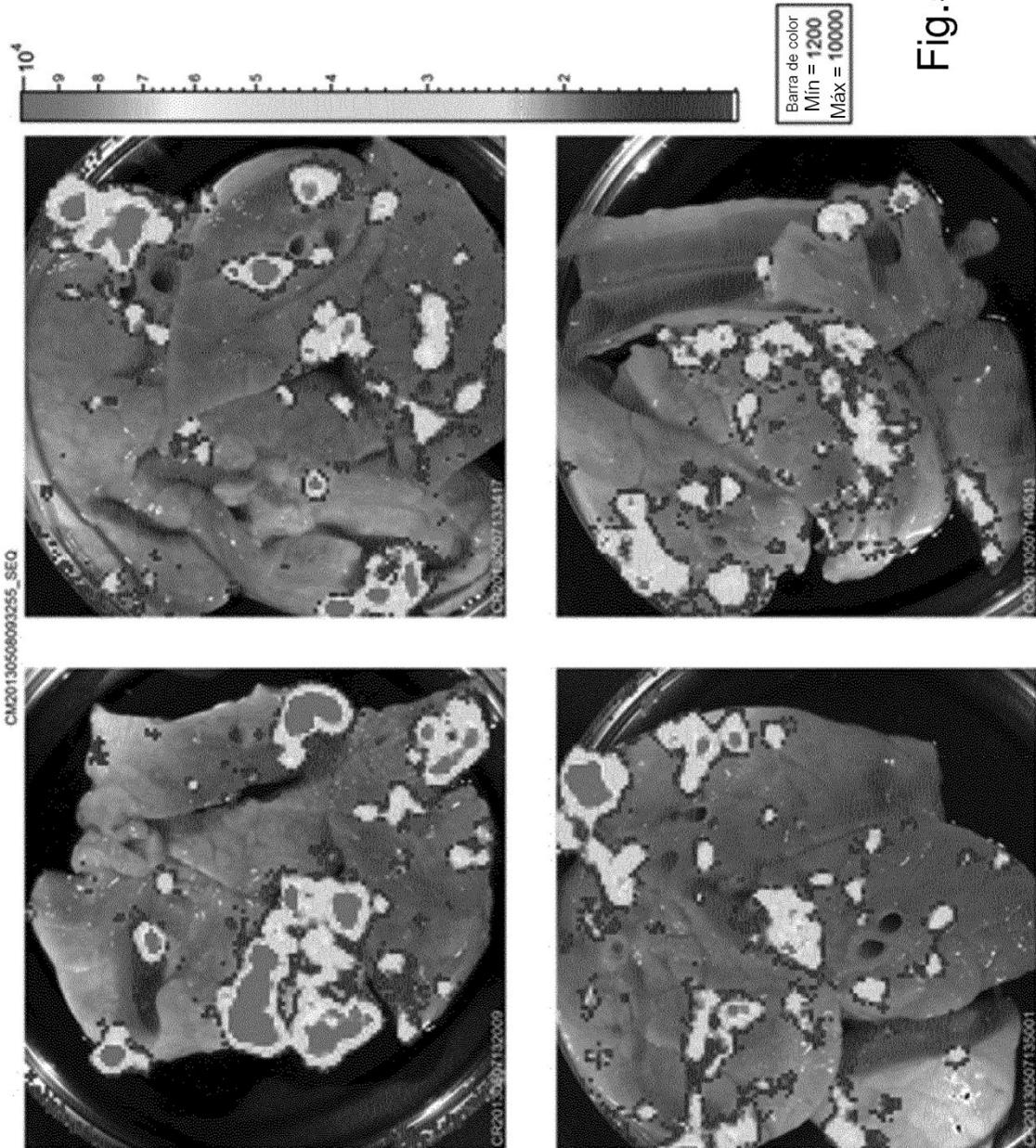


Fig.5b



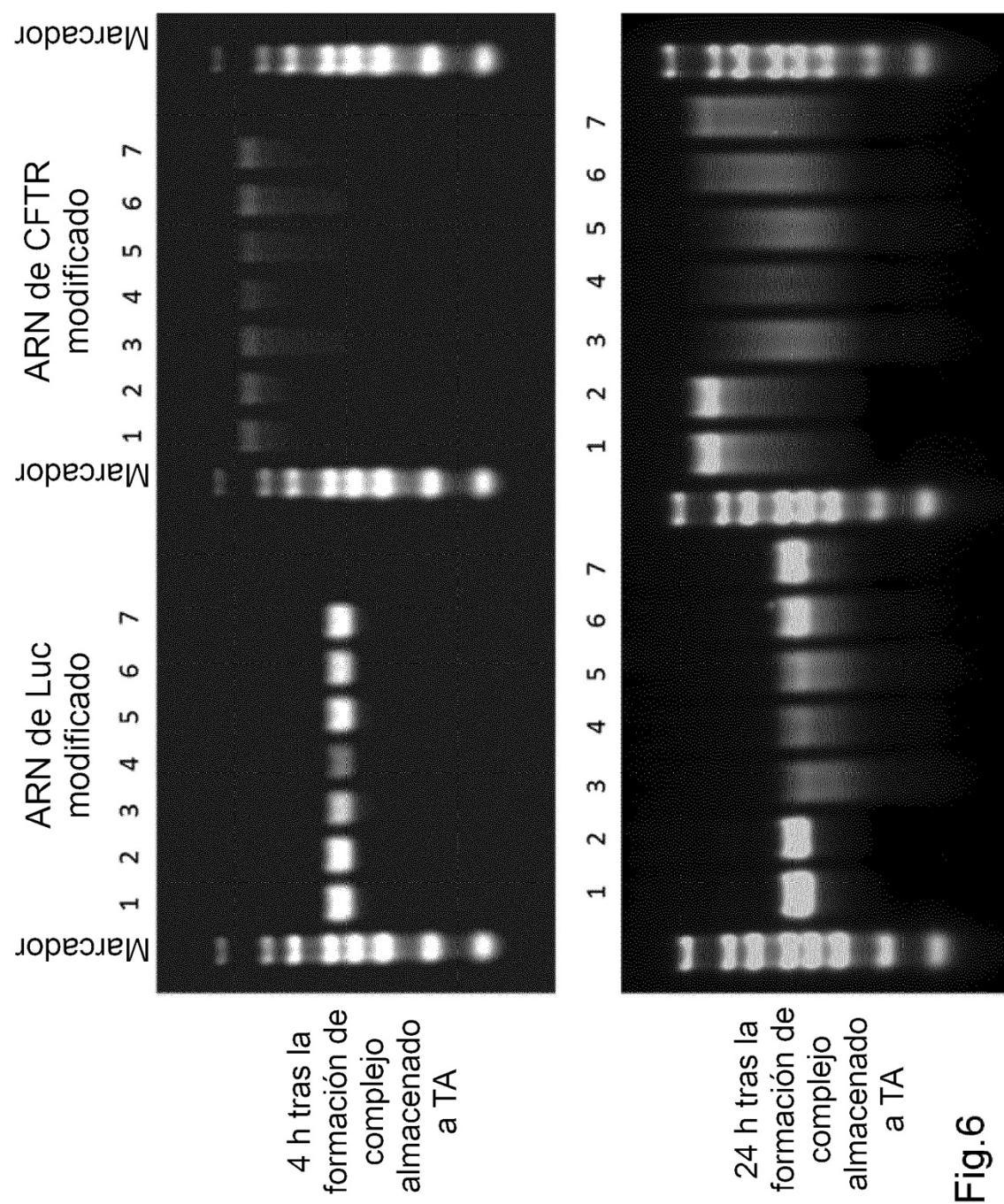


Fig.6