

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 687 442**

51 Int. Cl.:

<b>A61K 47/59</b>	(2007.01)
<b>A61K 47/64</b>	(2007.01)
<b>A61K 48/00</b>	(2006.01)
<b>C12N 15/88</b>	(2006.01)
<b>A61K 9/00</b>	(2006.01)
<b>A61P 11/00</b>	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2010 PCT/EP2010/007846**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.06.2011 WO11076391**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2010 E 10805775 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2515945**

54 Título: **Conjugado con iloprost o treprostinil como ligando de hallazgo de diana y su uso**

30 Prioridad:

**21.12.2009 EP 09015812**

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

**25.10.2018**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**RUDOLPH, CARSTEN y  
GEIGER, JOHANNES-PETER**

74 Agente/Representante:

**ARIAS SANZ, Juan**

ES 2 687 442 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

Conjugado con iloprost o treprostnil como ligando de hallazgo de diana y su uso

La invención se refiere a conjugados que contienen un complejo de agente, que como estructura de hallazgo de diana presentan un análogo de prostaciclina, siendo el análogo de prostaciclina iloprost o treprostnil, siendo el complejo de agente un agente envuelto por un polímero catiónico como material de envoltura y siendo el agente un ácido nucleico, y al uso de tales conjugados para la terapia génica o la transferencia genética en células epiteliales bronquiales y alveolares.

El pulmón es por un lado un órgano, cuya función es vital y por otro lado el pulmón es un órgano, que debido a su gran superficie y su accesibilidad es atractivo para introducir principios activos o agentes activos en el cuerpo.

Desde hace ya mucho tiempo se conoce llevar agentes activos al pulmón a través de aerosoles, nebulizadores, inhaladores o pulverizadores de bombeo para un efecto tanto local como sistémico. También se conoce administrar para la terapia génica agentes de transferencia genética virales o no virales a través del pulmón. Los agentes portadores tanto virales como no virales están asociados de múltiples maneras con efectos secundarios en el caso de su utilización. Esto está condicionado en particular porque la dosis tiene que ser relativamente alta, dado que la transferencia genética, es decir la introducción de los genes deseados en células con frecuencia no es suficientemente eficaz. Por tanto, desde hace mucho tiempo están buscándose agentes, para mejorar la eficacia de la transferencia genética. Para ello se ha propuesto ya, envolver genes con un lípido catiónico, dado que las partículas catiónicas pueden fagocitarse más fácilmente. Un agente propuesto para ello, que ya se somete a prueba en ensayos clínicos [7], es Genzyme Lipid 67. También se conoce el uso de polímeros de polietilimina (PEI), para envolver ácidos nucleicos [8]. Aunque la PEI puede proteger el ADN, está asociado con la desventaja de que la eficacia de transferencia genética es reducida, además se ha encontrado que, a una dosis alta, que es necesaria debido a la eficacia de transfección reducida, provoca inflamaciones.

Por tanto, también se ha intentado ya dotar partículas envueltas con polímeros catiónicos de ligandos, que deben introducir las partículas en células. Ha habido ya intentos con transferrina [10], ácido fólico [11], lactoferrina [12], clenbuterol [13] y factores de crecimiento, tal como EGF [14]. Aunque con estos ligandos pudo mejorarse la transferencia genética mediada por PEI, sigue existiendo la necesidad de suministrar agentes activos al pulmón de manera dirigida y con un mayor rendimiento.

Además, se ha intentado y se intenta encontrar nuevas vías para el tratamiento terapéutico de enfermedades pulmonares crónicas, para las que la transferencia genética es un planteamiento muy prometedor. Las enfermedades pulmonares basadas en defectos proteicos y/o genéticos congénitos o adquiridos podrían mejorarse, aliviarse o incluso curarse proporcionando las proteínas o los productos génicos que faltan o dañados. Sin embargo, para ello la administración tiene que tener lugar regularmente. Por tanto, tiene que encontrarse un equilibrio entre los efectos secundarios no deseados y el efecto terapéutico deseado. Además, la frecuencia de dosificación necesaria para una terapia de larga duración es también un aspecto importante.

Por tanto, el objetivo de la invención era proporcionar conjugados, que posibiliten proporcionar principios activos o agentes activos, que sean adecuados para el tratamiento o el alivio de enfermedades pulmonares, en una forma que pueda absorberse de manera dirigida por las células en el pulmón, en particular de células epiteliales bronquiales y alveolares.

Este objetivo se soluciona con un conjugado, tal como se define en la reivindicación 1.

Sorprendentemente se ha encontrado que las células epiteliales en el pulmón, es decir células epiteliales bronquiales y células epiteliales alveolares portan receptores  $IP_1$  y que estos receptores pueden direccionarse para una transferencia eficaz de partículas que contienen principios activos. Con los conjugados según la invención se consigue controlar células epiteliales en los bronquios y alveolos de manera dirigida a través de estos receptores  $IP_1$  mediante el uso de al menos un análogo de prostaciclina como estructura de hallazgo de diana.

A continuación se describirá detalladamente el objeto de la invención y se expondrán más detalladamente las propiedades y ventajas. La invención también se explicará más detalladamente en las figuras adjuntas, en las que:

La figura 1 muestra los resultados de un análisis de inmunotransferencia de tipo Western de la expresión de receptor  $IP_1$  en células epiteliales alveolares y bronquiales humanas.

La figura 2 muestra la intensidad de fluorescencia de células A549 y 16HBE14o tras la incubación con FLUO-BSA-ILO o FLUO-BSA-TRP.

La figura 3a muestra la intensidad de fluorescencia de FLUO-BSA en comparación con FLUO-BSA-ILO en diferentes líneas celulares; la figura 3b y la figura 3c muestran las intensidades de fluorescencia medias con concentraciones crecientes de CAY10449 o ILO; la figura 3d muestra la intensidad de fluorescencia media de FLUO-BSA-ILO tras la adición de CAY10449; la figura 3e muestra fotografías de microscopía confocal de barrido láser para la unión superficial.

La figura 4 muestra la liberación de ADN para constructos de PEI-g-ILO con diferentes razones de N/P.

La figura 5a muestra el grado de expresión para células transfectadas con vectores génicos PEI-g-ILO en comparación con PEI modificada; la figura 5b muestra la expresión génica para PEI-g-ILO en comparación con PEI; la figura 5c muestra los grados de expresión para PEI-g-ILO en células A549 y BEAS-2B en comparación con PEI.

- 5 La figura 6a muestra estudios *in vivo* para la expresión génica de luciferasa; la figura 6b muestra la expresión de luciferasa en tejido pulmonar homogeneizado, que se obtuvo de ratones, que habían recibido vectores génicos PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$ , en comparación con vectores génicos PEI.

10 La figura 7a muestra la actividad metabólica de células no tratadas en comparación con células tratadas con PEI o constructo según la invención; la figura 7b muestra la variación del nivel de citocina tras la administración de PEI o constructo según la invención en comparación con células no tratadas.

La figura 8 muestra el suministro de vectores génicos en función de la dosis en células pulmonares.

15 Se encontró sorprendentemente que los conjugados, que portan análogos de prostaciclina como estructura de hallazgo de diana, son adecuados para el direccionamiento de células epiteliales en el pulmón, en particular de células bronquiales y alveolares y pueden introducir con alta eficacia agentes en las células. Con ello se proporciona ahora según la invención un agente, para introducir sustancias contenidas activas en células epiteliales pulmonares. Esto ofrece nuevas posibilidades para el tratamiento terapéutico de las más diversas enfermedades pulmonares.

20 La prostaciclina pertenece a la clase de las prostaglandinas y se conoce como prostaglandina  $I_2$  o  $PGI_2$ ; se direcciona y se une al receptor de prostaciclina ( $IP_1$ ). El receptor  $IP_1$  es un receptor acoplado a proteína G 7-transmembrana, que se encontró sobre todo en células endoteliales, en particular en células musculares, por ejemplo en células musculares de vasos sanguíneos [15-17]. La unión de prostaciclina a un agonista de receptor  $IP_1$  conduce a una internalización endosomal de complejos de receptor/ligando a través de procesos mediados por clatrina [18, 19]. Los inventores de la presente invención han encontrado ahora que este efecto puede aprovecharse para mejorar la transferencia dirigida de agentes activos en células epiteliales alveolares y bronquiales y posibilitar la absorción de agentes activos útiles para el pulmón o de terapia para afecciones pulmonares.

25 Por tanto, según la invención se proporciona un conjugado, que como estructura de guiado a la diana para células epiteliales bronquiales y alveolares presenta al menos un análogo de prostaciclina, siendo el análogo de prostaciclina iloprost o treprostnil. La propia prostaciclina es demasiado inestable y se degrada demasiado rápido, para poder usarse para el propósito previsto. Sin embargo, se conocen análogos de prostaciclina estables, que se unen igualmente al receptor  $IP_1$  y actúan como agonistas. Como análogo de prostaciclina se denomina en este caso un compuesto, que se deriva del ácido prostanoico, que presenta una capacidad de unión al receptor  $IP_1$  comparable o mayor que la prostaciclina y una estabilidad mayor que la prostaciclina natural. Tales compuestos se conocen. Para los conjugados según la invención son adecuados los análogos de prostaciclina conocidos iloprost y treprostnil.

Como ligandos se usan iloprost y/o treprostnil, dos análogos de prostaciclina autorizados como fármacos.

35 Un análogo de prostaciclina adecuado para la invención es aquel que es más estable en un entorno fisiológico y/o durante el almacenamiento que la prostaciclina que aparece de manera natural. Como se expone anteriormente, la prostaciclina se degrada muy rápido, tiene en un entorno fisiológico, es decir en la sangre, una semivida de solo pocos minutos y no puede almacenarse durante mucho tiempo. Por tanto, según la invención son adecuados aquellos análogos de prostaciclina, que en un entorno fisiológico conservan al menos 20 minutos, preferiblemente al menos 30 minutos, aún más preferiblemente al menos 45 minutos sus propiedades, sin degradarse o inactivarse o aquellos que en un entorno fisiológico tienen una semivida de al menos 15 minutos, preferiblemente al menos 20 minutos, más preferiblemente al menos 25 minutos. Por semivida se entiende en este caso en general el periodo de tiempo, en el que en un entorno fisiológico la mitad del material de partida, en este caso el análogo de prostaciclina, se ha descompuesto o se inactivó o transformó. La semivida puede establecerse habitualmente de manera sencilla, por ejemplo añadiendo el análogo de prostaciclina en cuestión a una solución fisiológica a una temperatura de 35-37°C y determinando el contenido en prostaciclina no descompuesta al principio y tras periodos de tiempo predeterminados.

50 Un análogo de prostaciclina adecuado para la invención es además aquel que tiene una capacidad de unión al receptor  $IP_1$  comparable o mayor que la prostaciclina. Un procedimiento, para establecer la capacidad de unión de un análogo de prostaciclina, es un procedimiento competitivo, en el que se conjuntan prostaciclina o un análogo de prostaciclina conocido, tal como iloprost y/o treprostnil, así como un candidato de análogo de prostaciclina con fluoresceína y albúmina sérica bovina (BSA) y entonces se añaden a diferentes líneas celulares pulmonares, estudiándose entonces la unión y la absorción celular mediante citometría de flujo y microscopía confocal de barrido láser. Un candidato, que se une con la misma intensidad o más intensamente que prostaciclina o iloprost o treprostnil, se describe igualmente como parte del conjugado descrito en el presente documento. Una misma capacidad de unión significa que el candidato marcado con fluoresceína se une al menos en la misma medida que la prostaciclina marcada con fluoresceína o iloprost marcado con fluoresceína o treprostnil marcado con fluoresceína. Si el porcentaje de candidatos marcados con fluoresceína es menor, esto significa que prostaciclina o iloprost o

treprostinil desplazan a los candidatos de la unión, de modo que su capacidad de unión no sea tan alta.

Los análogos de prostaciclina conocidos se usan para el tratamiento de hipertensión arterial pulmonar (HAP) y se administran habitualmente por vía intravenosa o como aerosol [20], tienen que dosificarse con frecuencia de manera distribuida a lo largo del día, para cumplir este propósito. Sin embargo, para la presente invención el análogo de prostaciclina se utiliza como estructura de hallazgo de diana y no sirve para el tratamiento de la hipertensión arterial pulmonar. Se encontró que en la combinación según la invención con una sustancia de envoltura catiónica y un agente los análogos de prostaciclina presentan un efecto antiinflamatorio y de este modo mejoran además el efecto de los conjugados según la invención.

La segunda parte del conjugado según la invención es un complejo de agente, es decir un agente envuelto por un material de envoltura. El material de envoltura sirve para proteger el agente y al mismo tiempo no alterar o dado el caso incluso mejorar la absorción en la célula.

El componente activo como principio de acción o principio activo del conjugado según la invención puede ser cualquier agente además de la prostaciclina, que en las células direccionadas por el ligando de hallazgo de diana según la invención ejerce un efecto ventajoso, curativo, paliativo o modulador, siendo el agente un ácido nucleico. Como ejemplos adicionales para agentes se describen en el presente documento péptidos o polipéptidos, principios activos o trazadores y/o derivados de dichas sustancias y/o mezclas de los mismos. El agente usado según la invención debe ser preferiblemente un agente, que puede aliviar o curar una afección pulmonar. Según la invención, el análogo de prostaciclina en este caso no se usa como principio activo sino solo como ligando de hallazgo de diana.

Según un aspecto de la presente invención, el agente es un ácido nucleico, que comprende un gen o fragmento génico, cuyo defecto o carencia provoca una enfermedad pulmonar o que codifica para una proteína de efecto inmunomodulador, en particular un antígeno. El ácido nucleico puede ser un ADN o ARN y puede presentar uno o varios genes o fragmentos. El ácido nucleico puede ser una secuencia que se integra o se replica de manera autónoma, puede estar como plásmido, vector o en otra forma ampliamente conocida para el experto en la técnica. Puede ser lineal o anular y mono- o bicatenario. Cualquier ácido nucleico activo en una célula es adecuado en este caso. Además, el ácido nucleico puede presentar de manera en sí conocida elementos adicionales, que son necesarios o útiles para la expresión del gen, por ejemplo promotores, potenciadores, secuencias de señalización, etc.

En una forma adicional, descrita en el presente documento, el componente activo de un conjugado descrito en el presente documento es un péptido, polipéptido, proteína o fragmento proteico, que es adecuado para remediar una carencia de proteína o un defecto proteico, que conduce a una enfermedad pulmonar, o que tiene un efecto inmunomodulador.

Además, el componente activo de un conjugado descrito en el presente documento puede ser un principio activo que, cuando está presente en una célula epitelial bronquial y/o alveolar, conduce a la curación o el alivio de un estado patológico en el pulmón. Ejemplos de esto son, por ejemplo, agentes antiinflamatorios tales como esteroides, que se utilizan para el tratamiento de asma. Dado que el ligando también tiene un efecto antiinflamatorio, esta combinación conduce a un agente muy eficaz.

En una forma adicional, descrita en el presente documento, el agente puede ser una molécula indicadora, cuya absorción en la célula puede proporcionar información diagnósticamente importante. El experto en la técnica conoce moléculas indicadoras, que son adecuadas para el diagnóstico, y ejemplos de moléculas indicadoras adecuadas son moléculas trazadoras radiactivas o fluorescentes, que conoce el experto en la técnica. Las moléculas indicadoras pueden utilizarse, por ejemplo, para comprobar la evolución de un tratamiento o el estado del pulmón.

Un componente esencial adicional del conjugado según la invención es un material de envoltura, que envuelve el agente, para protegerlo frente a la degradación o variación y que no altera la introducción en la célula o incluso la promueve. El material de envoltura es de manera adecuada un polímero catiónico. Es importante que el material de envoltura sea biológica y fisiológicamente compatible, proteja el agente durante el transporte y se degrade en la célula para dar moléculas fisiológicamente compatibles y sea inerte con respecto al agente, es decir no reacciona con el agente. Se conocen materiales de envoltura adecuados y se ofrecen en múltiples formas. Para la envuelta de ácidos nucleicos se usan materiales de envoltura catiónicos. Para envolver otros agentes descritos en el presente documento, tal como proteínas, principios activos o trazadores, pueden usarse materiales de envoltura catiónicos o neutros.

Según la presente invención, es decir cuando el agente es un ácido nucleico, como material de envoltura se usa un polímero catiónico. Se encontró que las partículas cargadas catiónicamente pueden absorberse más fácilmente por la célula que las partículas neutras o cargadas aniónicamente, sin embargo también pueden promover adhesiones más bien inespecíficas. Para la envoltura de ácidos nucleicos como componentes activos se prefieren materiales de envoltura catiónicos, dado que los ácidos nucleicos pueden envolverse y protegerse muy fácilmente con sustancias catiónicas. El experto en la técnica conoce ampliamente procedimientos correspondientes.

El material de envoltura dado a conocer en el presente documento puede ser una sustancia que aparece de manera

natural, sintética o natural derivada catiónicamente, por ejemplo un lípido o un polímero u oligómero. Un ejemplo de un oligómero natural es la espermina. Ejemplos de polímeros sintéticos son polímeros que pueden degradarse biológicamente que contienen nitrógeno, en particular aquellos con átomos de nitrógeno protonables. El material de envoltura en relación con la invención es un polímero catiónico. Son especialmente adecuadas polietileniminas, en particular polietileniminas ramificadas, que pueden obtenerse en el mercado. Es adecuada, por ejemplo, una polietilenimina ramificada con un peso molecular medio de 25 kDa, que está disponible comercialmente. Se encontró que este polímero en combinación con el ligando de hallazgo de diana es muy compatible. Como material de envoltura formador de capas natural dado el caso derivatizado se describen en el presente documento también lípidos, en particular lípidos catiónicos o neutros. Los lípidos están disponibles en muchas variantes y pueden utilizarse, por ejemplo, para la formación de liposomas. En el presente documento se describe especialmente un lípido derivatizado catiónicamente, que puede obtenerse con la denominación Genzyme Lipid 67. Menos adecuados son los polímeros construidos en base a moléculas sacáricas, como almidones o derivados de almidón, que por tanto no se usan como material de envoltura según la invención.

Para otros agentes descritos en el presente documento, tales como proteínas, principios activos o trazadores, hay un número de polímeros adecuados, que conoce el experto en la técnica. Son adecuados aquellos que son biológicamente compatibles y que al menos en combinación con el análogo de prostaciclina según la invención no son inflamatorios o dañinos de otra manera y liberan el agente, en cuanto ha llegado al sitio diana, en la célula.

El complejo de agente que consiste en material de envoltura y agente puede estar compuesto por ejemplo por nanopartículas o nanocápsulas, liposomas, etc. en sí conocidos, cuya producción se conoce ampliamente. Es adecuado, por ejemplo, el encapsulamiento en polímeros que pueden degradarse biológicamente con liberación ajustable, tal como polilactida y/o poliglicólido. A este respecto, el material de envoltura puede seleccionarse de tal manera que la liberación del agente tenga lugar de manera predeterminada. Tales materiales de envoltura se describen de múltiples maneras en la bibliografía y el experto en la técnica puede seleccionar de un gran número de materiales el más adecuado en cada caso.

El agente activo se envuelve de manera en sí conocida con el material de envoltura o se encapsula en el mismo. Este complejo de agente y material envolvente se denominará a continuación también "complejo de agente". Por "envolver" en relación con la presente invención se entiende que el agente se apantalla mediante el polímero del entorno fisiológico de tal manera que no se varía ni se degrada, hasta que ha alcanzado el sitio diana. La envoltura puede ser solo una capa, que rodea el agente, también puede ser un liposoma o una nano- o micropartícula, en el que está incrustado o incluido el agente. También puede estar encerrado mediante complejación. El experto en la técnica conoce diferentes formas de encapsulación o envoltura de agentes y pueden utilizarse para el conjugado según la invención, siempre que no alteren la unión del ligando de hallazgo de diana al receptor y la introducción del conjugado en la célula y liberan en la célula el agente. La envoltura del agente con el material de envoltura o la producción de partículas correspondientes puede tener lugar con procedimientos habituales. En la forma de realización más sencilla, el agente activo, un ácido nucleico, se mezcla con el material de envoltura, un polímero catiónico tal como polietilenimina, dado el caso en forma disuelta.

A la sustancia de envoltura se une o bien antes de la envoltura o bien después al menos un análogo de prostaciclina según la invención usado como estructura de guiado a la diana. Mediante la unión del ligando al material de envoltura no se perjudica la actividad del agente. La unión o inmovilización del o de los ligandos no puede alterar la capacidad de unión al receptor. El experto en la técnica conoce procedimientos para la inmovilización de ligandos y los procedimientos conocidos pueden emplearse en este caso. El experto en la técnica puede establecer la idoneidad de una combinación de sustancia de envoltura y ligando de manera sencilla, al producir a partir de la misma el complejo de agente deseado y compara la capacidad de unión del complejo con la capacidad de unión del ligando libre. Además, puede establecerse la idoneidad de una sustancia de envoltura con respecto al agente, al determinar la actividad del agente tras la liberación y compararla con la del agente libre antes de la envoltura.

Los ligandos pueden unirse directamente al material de envoltura, antes de que se utilice para envolver el agente. Se prefiere esta forma de realización, dado que el material de envoltura es un polímero catiónico y el agente es un ácido nucleico. También es posible formar en primer lugar el complejo de agente y a continuación unirse a los ligandos. Se prefiere esta forma de realización, cuando el complejo de agente se forma en forma de nanopartículas, nanoesferas o liposomas. Dado el caso, la unión del ligando al material de envoltura también puede tener lugar a través de un espaciador, de tal manera que el sitio activo para la unión del ligando esté accesible para la unión. Por consiguiente se crea un conjugado, en el que no se influye en el agente activo mediante la unión y el al menos un análogo de prostaciclina está disponible libremente en la superficie para la unión al receptor IP<sub>1</sub>. El ligando, es decir el análogo de prostaciclina, puede unirse mediante cualquier tipo de unión, tal como enlace covalente, iónico o coordinado, formación de puentes de hidrógeno, etc., al material de envoltura, siempre que la unión sea suficiente para inmovilizar el ligando y su capacidad de unión al receptor no se vea perjudicado. Así, el acoplamiento del análogo de prostaciclina al material de envoltura puede tener lugar, por ejemplo, a través de un enlace covalente o iónico directamente o a través de un espaciador. Un espaciador conocido por el experto en la técnica es, por ejemplo, polietilenglicol (PEG).

El grado de acoplamiento, es decir la medida de carga del conjugado o de las partículas envueltas con ligandos expresada como ligando por partículas de conjugado, tiene influencia sobre la liberación del agente y con ello sobre

la actividad del agente en la célula. El porcentaje de los ligandos que deben unirse a una partícula envuelta no debe ser preferiblemente demasiado alto, dado que, de lo contrario, debido a impedimento estérico, podría estar alterado el direccionamiento del receptor. El experto en la técnica puede descubrir la carga adecuada con ensayos rutinarios. El porcentaje de ligandos depende del tipo del material de envoltura y del tamaño de las partículas.

- 5 También se encontró que un alto grado de acoplamiento puede conducir a que el agente ya solo se libere de manera incompleta. Si se usa un polímero catiónico para la envoltura, entonces el grado de acoplamiento debe ser de 15 ligandos por polímero o menor. Por otro lado, por partícula envuelta debe estar unido al menos un análogo de prostaciclina, para provocar el direccionamiento.

- 10 Por conjugado o partícula puede estar unido en cada caso un tipo de análogo de prostaciclina. También es posible unir una mezcla de dos o más análogos de prostaciclina, para potenciar dado el caso la capacidad de unión y/o la absorción en la célula.

- 15 Se encontró que la razón de material de envoltura con respecto a agente activo puede tener influencia sobre la eficacia. Cuando está presente demasiado poco material de envoltura, el agente activo no se protege suficientemente. Si el porcentaje del material de envoltura es demasiado alto, puede haber por un lado problemas con la compatibilidad y por otro lado un porcentaje demasiado alto de material de envoltura puede conducir a que ya no pueda liberarse el agente activo. En ambos casos se ve perjudicada la eficacia de la transferencia. El experto en la técnica puede descubrir en pocos ensayos rutinarios la razón más adecuada en cada caso. Ha resultado ser especialmente adecuada una razón de material de envoltura con respecto a agente activo en el intervalo de desde 20 10:1 hasta 1:4, con respecto al peso. Se prefiere especialmente una razón de material de envoltura con respecto a agente de desde 4:1 hasta 1:4. Cuando el conjugado contiene un ácido nucleico como agente y polietilénimina como polímero, también puede indicarse el porcentaje del polímero a través de la razón molar de porcentaje de nitrógeno del polímero con respecto a porcentaje de fosfato del ADN; preferiblemente esta razón se encuentra en un intervalo de desde 2 hasta 10, de manera especialmente preferible desde 4 hasta 8. Se encontró que el diámetro hidrodinámico de las partículas de conjugado a una razón molar de porcentaje de nitrógeno del polímero con respecto a porcentaje de fosfato del ADN de desde 4 hasta 8 se encuentra en un intervalo de desde 50 hasta 25 100 nm, lo que es óptimo para las propiedades de absorción.

- 30 Además, se estableció que se obtienen conjugados óptimos cuando la densidad de carga de los ligandos se adapta al grado de envoltura. Cuando el porcentaje de material de envoltura es relativamente alto, la densidad de carga no debería ser demasiado alta, dado que de lo contrario se apantalla demasiado intensamente el agente. Cuando el porcentaje de material de envoltura se encuentra en el intervalo inferior, la densidad de carga puede encontrarse de manera correspondiente en el intervalo superior.

- 35 Se encontró que el conjugado según la invención es un agente ideal, para introducir principios activos en células epiteliales bronquiales y/o alveolares. Mientras que con las partículas descritas en el estado de la técnica sin ligandos diana o ligandos de guiado de diana solo el 5% o menos alcanzan su diana, la célula, y con los conjugados que contienen ligandos descritos en el estado de la técnica también solo un porcentaje por debajo del 50% o menos alcanzan la diana y pueden desplegar la función, en ensayos para los conjugados según la invención pudo mostrarse que más del 50%, con frecuencia el 60% y más e incluso hasta el 80% del conjugado según la invención se absorben por células y liberan su agente.

- 40 Por consiguiente, se pone a disposición un agente, con el que se introduce un componente activo con alta eficacia en células diana, protegiéndose bien por un lado el agente activo durante el transporte a la célula, de modo que el porcentaje de agente activo, que llega a la célula, es muy alto y siendo por otro lado la eficacia de absorción muy alta debido a la estructura del conjugado según la invención.

- 45 En una forma de realización adicional, el conjugado según la invención puede mejorarse aun adicionalmente, al dotar la partícula envuelta con material de envoltura, un polímero catiónico, aun adicionalmente de cadenas de polietilenglicol, para aumentar adicionalmente la supervivencia en el pulmón. Proteger moléculas activas, tal como ácido nucleico, mediante pegilación se conoce en sí y en este caso pueden usarse los procedimientos habituales.

- 50 El conjugado según la invención puede usarse para el tratamiento de diferentes enfermedades pulmonares. En particular, el conjugado según la invención es adecuado para curar o aliviar enfermedades pulmonares basadas en defectos genéticos o proteicos. Un ejemplo de esto es la fibrosis quística. Como se expuso anteriormente, es posible tanto introducir el gen que falta o deficiente en la célula, como introducir una proteína codificada por el gen que falta o deficiente en la célula.

- 55 Un campo de aplicación adicional para los conjugados según la invención es el uso como vacuna. En esta forma de realización, el componente activo del conjugado es un gen, que codifica para una proteína o péptido activo de manera inmunomoduladora o inmunológica [1, 2]. Una ventaja de esta forma de realización de la invención es que a través del pulmón puede suministrarse de manera no invasiva una vacuna, por ejemplo con un nebulizador o a través de un aerosol. Esta tecnología no es complicada, posibilita la utilización también allí donde es problemática la administración de inyecciones debido a las condiciones higiénicas o debido a la ausencia de personal formado de manera correspondiente y posibilita una dosificación múltiple sin complicación, para reforzar la respuesta

inmunitaria. Además, el pulmón es muy adecuado para una vacunación debido a su gran superficie y la presencia de células inmunológicamente activas.

5 El conjugado según la invención se proporciona para la administración al pulmón. Para ello puede formularse de manera en sí conocida como composición farmacéutica, que se lleva al pulmón mediante inhalación o a través de nebulización. El experto en la técnica conoce formulaciones correspondientes. Así, el conjugado puede producirse como suspensión o emulsión a través de un nebulizador o como aerosol, con un gas inerte como agente portador. También puede utilizarse como polvo.

La presente invención se explica adicionalmente mediante los siguientes ejemplos, sin limitarse a este ejemplo.

#### Ejemplo 1

10 Se produjeron y estudiaron conjugados de partículas envueltas con un material de envoltura e iloprost o treprostinil como estructura de hallazgo de diana.

#### Materiales y métodos

Las fuentes de adquisición para productos químicos y plásmidos y las concentraciones usadas son tal como siguen:

iloprost, treprostinil y CRY10449: Cayman Chemicals (Michigan, EE. UU.)

15 polietilenimina ramificada (peso molecular promedio 25 kDa), N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS), albúmina sérica bovina (BSA), fosfato de sodio, disolución de ácido picrilsulfónico, ácido 4-(2-hidroxiethyl)piperazin-1-etanosulfónico (HEPES) y heparán sulfato: Sigma Aldrich (Schnelldorf, Alemania)

la PEI se diluyó en agua destilada doblemente (agua para inyección, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Alemania) y se ajustó el pH con ácido clorhídrico a 7.

20 se disolvió fosfato de sodio en agua destilada doblemente hasta una concentración de 0,5 mM y se ajustó el pH con hidróxido de sodio a 7,5.

se disolvió HEPES en agua destilada a una concentración de 0,1 M y se ajustó el pH con hidróxido de sodio a 7,4.

se disolvió heparán sulfato en agua destilada doblemente a una concentración de 5 mg/ml.

etanol p.a. y ácido 3-(N-morfolino)propanosulfónico (MOPS): Merck (Darmstadt, Alemania)

25 se disolvió MOPS en agua destilada doblemente hasta una concentración de 0,1 M y se ajustó el pH con ácido clorhídrico a 6.

clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC) y éster succinimidílico de 5- (y 6-) carboxifluoresceína (fluoresceína-NHS): Pierce (Rockfort, EE. UU.)

ditiotreitól (DTT): Amersham Biosciences (South San Francisco, EE. UU.)

30 D-luciferina: Synchem OHG (Flensburg/Altenburg, Alemania)

Los plásmidos pCMV-luc, que contenía el gen de luciferasa de *Fotinus pyralis* bajo el control del promotor prematuro de citomegalovirus (CMV) y pCpG-luc se propagaron en *E. coli* y se proporcionaron en una forma muy pura (contenido en LPS  $\leq 0,1$  E.U./ $\mu\text{g}$  de ADN) de Plasmid Factory GmbH (Bielefeld, Alemania). La cantidad de Supercoil pDNA era  $\geq 90\%$  ccc (*covalently closed circular*) para pCMV-luc y  $\geq 98\%$  ccc para pCpG-luc.

35 Líneas celulares usadas

células A549 (células epiteliales alveolares humanas): DSMZ (Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares, Braunschweig, Alemania)

BEAS-2B (células epiteliales bronquiales humanas), H441 (células epiteliales bronquiales humanas): ATCC (Colección Americana de Cultivos Tipo)

40 células 16HBE14o-: células epiteliales bronquiales humanas

Se cultivaron líneas celulares A549, BEAS-2B y 16HBE14o- en medio esencial mínimo (MEM, Gibco-BRL, Karlsruhe, Alemania), que estaba suplementado con suero bovino fetal al 10% (FCS, Gibco-BRL, Karlsruhe, Alemania), a 37°C en una atmósfera de aire humedecida suplementada con un 5% de CO<sub>2</sub>. La línea celular H441 se cultivó en medio del Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640, Gibco-BRL, Karlsruhe, Alemania), que estaba complementado con FCS al 10%, a 37°C en una atmósfera de aire humedecida enriquecida con un 5% de CO<sub>2</sub>.

45

#### Animales

Se mantuvieron ratones BALB/c hembra de 14 semanas de edad (Charles River Laboratories Sulzfeld, Alemania) en condiciones libres de patógenos específicas. Los ratones se aclimataron al menos durante 7 días antes de los ensayos. Todos los procedimientos con animales estaban autorizados y se controlaron por la comisión ética local y se realizaron según las directrices de la legislación alemana para la protección de la vida animal.

#### 5 Análisis de inmunotransferencia de tipo Western

Se lavaron células A549, BEAS-2B y 16HBE14o- con PBS y se lisaron sobre hielo en tampón de lisis, que contenía Tris-HCl 20 mM (pH 7,5), NaCl 100 mM, EDTA 1 mM, Triton X-100 al 1% y desoxicolato de sodio al 0,05%. Se suministraron de nuevo DTT 1 mM y cóctel de inhibidor de proteasa (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) directamente antes del uso. Las concentraciones de proteína se determinaron usando un ensayo de proteína Biorad (Biorad, Múnich, Alemania). Para cada línea celular se diluyeron 50 µg de proteína en tampón de carga de muestra de SDS (Tris-HCl 62,5 mM (pH 6,8), SDS al 2%, glicerina al 10%, DTT al 2%, azul de bromofenol al 0,001%), que había experimentado ebullición durante 5 min, se separaron en un gel de Tris-HCl al 7,5% (Biorad, Múnich, Alemania) y se pasaron a una membrana de PVDF (Millipore, Schwalbach, Alemania). Se bloquearon las membranas con TBS-T (Tris-HCl 20 mM (pH 7,6), NaCl 137 mM, Tween-20 al 0,1%), que contenía un 5% de leche en polvo desnatada (Sigma Aldrich, Deisenhofen, Alemania) durante 1 h a temperatura ambiente. El anticuerpo policlonal primario (diluido 1:500) para el receptor IP<sub>1</sub> (Cayman Chemical, Michigan, EE. UU.) se incubó durante la noche en un 0,5% de leche desnatada. Las membranas se lavaron con TBS-T y se incubaron con un anticuerpo anti-conejo conjugado con HRP secundario (diluido 1:15.000; Biorad, Múnich, Alemania) durante 1,5 h a temperatura ambiente en un 0,5% de leche desnatada. Tras varias etapas de lavado con TBS-T tuvo lugar la detección por quimioluminiscencia usando un kit de detección ECL (Pierce, Rockfort, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante.

#### Síntesis de fluoresceína-BSA-iloprost (FLUO-BSA-ILO) y fluoresceína-BSA-treprostinil (FLUO-BSA-TRP)

Se diluyeron 20 mg (0,3 µmol) de BSA en 2,5 ml de tampón fosfato de sodio, pH 7,5, y se mezclaron con un exceso molar de diez veces de fluoresceína-NHS. Tras agitar una hora a temperatura ambiente se purificó la mezcla en una columna Sephadex G25 MPD-10 equilibrada con PBS (GE Health Care, Uppsala, Suecia). Se disolvieron o bien 0,7 mg (1,8 µmol) de ILO o 0,8 mg (1,8 µmol) de TRP in 130 µl de etanol p.a. y se mezclaron con 370 µl de tampón MOPS, 0,1 M, pH 6. Se añadieron 0,5 mg (5 mM) de sulfo-NHS (en tampón MOPS) y 0,2 mg (2 mM) de EDC (en tampón MOPS) y se agitaron durante 15 min a temperatura ambiente. Después se añadieron 5 µl (20 mM) de DTT (en agua destilada) e inmediatamente se pipetearon 3 mg (45,2 nmol) de FLUO-BSA en 190 µl y 210 µl de tampón fosfato 0,5 M en la mezcla de reacción. Tras agitar dos horas a temperatura ambiente se purificó la mezcla en una columna Sephadex G25 MPD-10 equilibrada con PBS (GE Health Care, Uppsala, Suecia). Las cantidades de BSA se evaluaron cuantitativamente con un ensayo proteico Biorad Proteinassay usando una curva patrón de BSA. La eficacia de acoplamiento de los productos finales e intermedios se determinó con un ensayo de TNBS [21] y se midió la extinción a 495 nm. El grado de acoplamiento de BSA-ILO y BSA-TRP se obtuvo como 10 mol de ILO o TRP por mol de BSA.

#### Síntesis de polímeros de PEI injertados con iloprost (PEI-g-ILO)

Se sintetizaron diferentes grados de acoplamiento de PEI-g-ILO mediante la variación de las cantidades de EDC, que se añadieron a la mezcla de reacción. Se diluyó 1 mg (2,8 µmol) de ILO en 100 µl de etanol p.a., se mezcló con 68 nmol de PEI en 900 ml de tampón HEPES, 0,1 M, pH 7,4, y 1 mg (5 mM) de sulfo-NHS. Se añadieron diferentes cantidades de EDC hasta una concentración final de 25 mM, 50 mM, 60 mM o 100 mM y se incubó durante 4 h con agitación a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se purificó en una columna Sephadex G25 MPD-10 equilibrada con agua destilada doblemente (GE Health Care, Uppsala, Suecia). La concentración de PEI se determinó con una prueba de CuSO<sub>4</sub> según Ungaro *et al.* [22]. Se registraron espectros de <sup>1</sup>H-1D-RMN de PEI-g-ILO en D<sub>2</sub>O en un espectrómetro Bruker AV 250 MHz. Los grados de acoplamiento de PEI-g-ILO se calcularon mediante la integración del multiplete ancho de PEI (CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH-) a δ (1H) = 2,5 a 3,1 ppm y del singlete del grupo metilo terminal de ILO (-C≡C-CH<sub>3</sub>) a δ (1H) = 1,73 ppm. La conjugación covalente de ILO a PEI condujo a cuatro grados de acoplamiento diferentes (F<sub>ILO</sub> (mol de ILO/mol de PEI) = 2, 5, 8, 16). Los constructos de PEI-g-ILO se repartieron en pequeñas alícuotas, se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido y se mantuvieron hasta su uso adicional a -80°C.

#### 50 Ensayo de incubación con FLUO-BSA-ILO y FLUO-BSA-TRP

La unión a receptor/absorción de FLUO-BSA-ILO se estudió en células A549, H441, 16HBE14o- y BEAS-2B. Para los ensayos de medición de FACS se sembraron 24 horas antes de la adición de los conjugados 100.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos (TPP, Trasadingen, Suiza). Se diluyeron conjugados de FLUO-BSA-ILO, FLUO-BSA-TRP y FLUO-BSA en MEM hasta una concentración de 0,5 µM y se incubaron las células 4 h a 37°C. Tras lavar las células con PBS se extrajeron las células de los pocillos con tratamiento con tripsina y se realizaron las mediciones de FACS usando un escáner de FACS Beckton-Dickinson (San José, EE. UU.). Para la microscopía confocal de barrido láser se realizaron los ensayos sobre soportes con 4 cámaras de BD Falcon Culture (BD Biosciences San José, EE. UU.) con 25.000 células por cámara. La incubación de FLUO-BSA-ILO y FLUO-BSA se realizó tal como se describió anteriormente. Las células se lavaron y se fijaron en paraformaldehído al 4% y a

continuación se tiñeron los núcleos celulares con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) 0,33  $\mu\text{M}$  y F-actina con Alexafluor® 568 Falloidin (Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Alemania) usando protocolos convencionales. Los soportes se cubrieron con medio (Vectashield, Vector Laboratories Inc., Berlingame, EE. UU.) y se tomaron imágenes con un microscopio confocal de barrido láser (Leica, Solms, Alemania).

#### 5 Ensayo para la inhibición de la unión de FLUO-BSA-ILO con CAY10449

Se estudió la inhibición de la unión a receptor/absorción de FLUO-BSA-ILO en células 16HBE14o-. Se prepararon placas de 24 pocillos, como se describió anteriormente. Se diluyó CAY10449 en MEM hasta concentraciones de 15  $\mu\text{M}$ , 30  $\mu\text{M}$  y 150  $\mu\text{M}$  y se incubó durante 15 min a 37°C. Inmediatamente después se añadieron FLUO-BSA-ILO y FLUO-BSA hasta una concentración final de 25 nM y se incubó con las células durante 4 h a 37°C. La unión/absorción se midió usando FACS.

#### Producción de las partículas de vector génico

Se diluyeron por separado plásmido que contiene gen indicador de luciferasa (pCMV-luc), PEI o PEI-g-ILO en 25  $\mu\text{l}$  de agua destilada doblemente. Se sometieron a prueba diferentes razones de N/P (razón molar de nitrógeno de PEI con respecto a fosfato de ADN). La disolución de pCMV-luc se añadió a un mismo volumen de la disolución de polímero y se mezcló cuidadosamente, pipeteando hacia arriba y hacia abajo ocho veces, lo que condujo a partículas con una concentración de 20  $\mu\text{g}$  de pCMV-luc/ml. Las partículas de transferencia genética se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente.

#### Medición del tamaño de partícula

El tamaño de partícula (determinado con dispersión de la luz dinámica) se midió usando un analizador Zeta PALS/Zeta Potential (Brookhaven Instruments Corporation, Viena, Austria). Se generaron partículas de vector génico tal como se describió anteriormente. Se usaron los siguientes ajustes: 5 pasadas con 1 min de medición por muestra; viscosidad para el agua 0,89 cP; índice de ref. 1.330; temperatura 25°C.

#### Prueba de retardo de ADN

Se produjeron partículas de vector génico PEI/pCMV-luc y PEI-g-ILO/pCMV-luc con diferentes grados de acoplamiento con N/P = 4 en agua destilada doblemente tal como se describió anteriormente. Se mezclaron 5  $\mu\text{l}$  de cada disolución de partículas o bien con 2  $\mu\text{l}$  de agua destilada doblemente o bien 2  $\mu\text{l}$  de disolución de heparán sulfato (5 mg/ml). Tras una incubación de 45 minutos con 1  $\mu\text{l}$  de tampón de carga (azul de bromofenol al 0,25%, Xylocyanol FF al 0,25%, glicerina al 30% en agua), se cargaron en pocillos individuales de un gel de agarosa al 0,8% y se separaron con electroforesis en gel de agarosa con 125 V durante 1 h. El gel se tiñó con bromuro de etidio y se hicieron visibles las bandas de ADN bajo luz UV.

#### Estudios de transfección *in vitro*

Se sembraron células A549, 16HBE14o- y BEAS-2B 24 h antes de la transfección con una densidad de 100.000 células/pocillo en placas de 24 pocillos (TPP, Trasadingen, Suiza) y se cultivaron en MEM, que contenía FCS al 10% y suplementado con penicilina/estreptomina al 0,1% (V/V). Antes de la transfección se lavaron las células con PBS y se añadieron 450  $\mu\text{l}$  de medio libre de suero nuevo por pocillo. A continuación se pipetearon 50  $\mu\text{l}$  de las partículas de vector génico, de manera correspondiente a 1  $\mu\text{g}$  de pCMV-luc, sobre las células. Para los ensayos de inhibición se añadió CAY10449 a medio nuevo con una concentración de 150  $\mu\text{M}$  15 min antes de la adición de las partículas de vector génico. Tras incubar durante 4 horas se sustituyó el medio de transfección por MEM, que contenía FCS al 10% y estaba suplementado con penicilina/estreptomina al 0,1% (V/V). 24 h tras la transfección se midió la actividad luciferasa usando un Wallac Victor<sup>2</sup> 1420 Multilabel Counters (Perkin Elmer, Boston, EE. UU.) según Huth *et al.* [23]. Los resultados se normalizaron a un contenido en proteínas celular total usando un ensayo proteico Biorad y BSA como patrón proteico.

#### Estudios de transferencia genética *in vivo*

Para producir partículas de vector génico para la administración de aerosol a ratones se diluyeron pCpG-luc y PEI o PEI-g-ILO  $F_{\text{ILO}} = 5$  en cada caso con 4,0 ml de agua para inyección (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Alemania), lo que condujo a concentraciones de 250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de pCpG-luc o 130,4  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de PEI (de manera correspondiente a una razón de N/P de 4). La disolución de pCpG-luc se pipeteó a la disolución de PEI, se mezcló pipeteando hacia arriba y hacia abajo 8 veces, lo que proporcionó una concentración de ADN definitiva de 125  $\mu\text{g}/\text{ml}$ . Las partículas se incubaron durante 20 min a temperatura ambiente antes de su uso. Las partículas se nebulizaron usando un dispositivo de inhalación PARI Turboboy<sup>®</sup>N con un nebulizador PARI LC+ (PARI GmbH, Starnberg, Alemania), que estaba conectado con un dispositivo de aerosol corporal total vertical según Rudolph *et al.* [24]. Tras 24 h se anestesiaron los ratones y tuvo lugar una administración pulmonar de sustrato de D-luciferina (1,5 mg/50  $\mu\text{l}$  de PBS por ratón) mediante inhalación [25]. Tras 10 min se midió la bioluminiscencia (IVIS 100 Imaging System; Xenogen, Alameda, EE. UU.) usando los siguientes ajustes de cámara: campo visual 10, F1 f-stop, High Resolution Binning y tiempo de exposición 10 min. Para confirmar los grados de expresión de gen indicador en

los pulmones se sacrificaron mediante dislocación cervical los ratones tras la absorción de bioluminiscencia *in vivo*. Tras abrir el peritoneo mediante un corte a lo largo de la línea central se seccionaron los pulmones de los animales y se perfundieron con PBS. Los pulmones se congelaron bruscamente en nitrógeno líquido y se homogeneizaron en estado congelado. Tras la adición de 400  $\mu$ l de tampón de lisis (Tris 250 mM, pH 7,8, Triton X-100 al 0,1%, comprimidos de cóctel de inhibidor de proteasa completo Roche) e incubación de 20 minutos sobre hielo se midió la actividad luciferasa en el sobrenadante usando un luminómetro tubular Lumat LB9507 (EG & G Berthold, Múnich, Alemania). Se usó luciferasa recombinante (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) como patrón, para calcular la cantidad de luciferasa, que se expresó en el tejido pulmonar.

#### Prueba a base de MTT

- Se evaluó la toxicidad de partículas de PEI/pCMV-luc o PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5/pCMV-luc$  en células 16 HBE14o- con una razón de N/P de 4. Las células se sembraron 24 h antes del ensayo con una densidad de 80.000 células/pocillo en una placa de 24 pocillos. La transfección tuvo lugar como se describió anteriormente. Tras 4 h se sustituyó la mezcla de transfección por 400  $\mu$ l de medio y se realizó una prueba basada en MTT usando el kit 1 de proliferación celular (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Alemania) según las instrucciones del fabricante. Las células no tratadas se usaron como referencia, al ajustar la absorción correspondiente al 100% de las células viables.

#### Acumulación de suero y análisis de la concentración de citocina

- 24 h tras la administración del aerosol se tomaron muestras de sangre de los ratones y se mantuvieron a 4°C durante la noche. Se centrifugó la sangre y se acumuló el suero. La determinación cuantitativa de interleucina-12 (IL-12) e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) tuvo lugar usando kits de INF- $\gamma$ -ELISA de ratón e IL-12 de ratón (P40/P70) (Ray Biotech, Norcross, EE. UU.) según las instrucciones del fabricante. Se usaron ratones no tratados como referencia, al fijar la concentración correspondiente a 1.

#### Análisis estadístico

Los resultados se indican como valor medio  $\pm$  la desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se evaluaron con la prueba de la T de Student no pareada.  $p < 0,01$  se consideró significativo.

#### Resultados

##### Confirmación de la expresión de receptor IP<sub>1</sub> en células pulmonares con inmunotransferencia de tipo Western

- La expresión de receptor IP<sub>1</sub> en células epiteliales alveolares (A549) y bronquiales (BEAS-2B, 16HBE14o-) humanas se confirmó con análisis de inmunotransferencia de tipo Western. Pudo identificarse una banda proteica a 47 kDa (figura 1), lo que corresponde a la forma glicosilada de la proteína receptora IP<sub>1</sub>, expresada sobre la membrana celular [26]. Por tanto, se estudió si es posible el control dirigido del receptor IP<sub>1</sub> para el suministro de proteínas o genes.

##### Control de células pulmonares con diferentes ligandos de receptor IP<sub>1</sub>

- Para estudiar el direccionamiento a la diana al receptor IP<sub>1</sub> para transferencia genética mediada por receptor, se acoplaron TRP e ILO químicamente a albúmina sérica bovina marcada con fluoresceína (FLUO-BSA), que servía como sustancia modelo. Mientras la incubación de células A549 y 16HBE14o- con FLUO-BSA condujo a una unión de fondo inespecífica, la incubación con FLUO-BSA-TRP y FLUO-BSA-ILO condujo al 5,5  $\pm$  0,5% o al 39,3  $\pm$  0,6% de células A549 positivas y al 51  $\pm$  1,8% o al 76,1  $\pm$  1,4% de células 16HBE14o- positivas (figura 2). La intensidad de fluorescencia media (MFI) de células A549 y 16HBE14o- fue significativamente mayor tras la incubación con FLUO-BSA-ILO que tras la incubación con FLUO-BSA-TRP. Estos resultados muestran que TRP y ILO pueden mediar una unión satisfactoria de la sustancia modelo FLUO-BSA a células pulmonares, pero que ILO es el ligando de guiado a la diana más eficaz.

##### Especificidad de la unión de FLUO-BSA-ILO a diferentes líneas celulares pulmonares

- Se estudió adicionalmente ILO como ligando de guiado a la diana en líneas celulares pulmonares adicionales debido a la mejor unión celular/absorción en comparación con TRP. Además de células A549 y 16HBE14o-, la incubación de células H441 y BEAS-2B con FLUO-BSA-ILO produjo un número significativamente mayor ( $p < 0,01$ ) de células positivas y MFI como control FLUO-BSA (38,0  $\pm$  1,8%) o 82,7  $\pm$  1,6% con respecto al 9,1  $\pm$  1,9% o 13,7  $\pm$  1,2% (Figura 3A). Este efecto era más claro en células epiteliales bronquiales humanas (16HBE14o-, BEAS-2B) que en células epiteliales Clara (H441) o alveolares (A549). Estos resultados muestran la diferente expresión de superficie de célula del receptor IP<sub>1</sub> en tipos de células pulmonares humanas.

- Para confirmar la especificidad de receptor de la unión observada de FLUO-BSA-ILO en células pulmonares, se incubaron células 16HBE14o- con FLUO-BSA-ILO en presencia de cantidades crecientes de CAY10449. De este compuesto ya se informó previamente que es un antagonista potente altamente específico del receptor IP<sub>1</sub> humano [27, 28]. Se incubaron células 16HBE14o- con FLUO-BSA-ILO 25 nM junto con concentraciones crecientes de CAY10449. La adición de CAY10449 condujo a una reducción dependiente de la dosis significativa ( $p < 0,01$ ) tanto

del número de células positivas para la fluorescencia como del MFI (figura 3B). A la concentración de CAY10449 máxima usada, el número de células positivas para la fluorescencia disminuyó del  $95,7 \pm 0,7\%$  al  $7,4 \pm 0,9\%$ . Las células, que se habían incubado con conjugados de FLUO-BSA, se usaron como controles y no mostraban ningún efecto durante la adición de CAY10449. Se obtuvieron resultados similares en ensayos competitivos con un exceso de ILO sin conjuguar.

Mediciones de FACS junto con ensayos de inhibición apuntan a una expresión en la superficie celular dependiente del tipo de célula del receptor IP<sub>1</sub> en células epiteliales pulmonares. Para seguir sometiendo a prueba si ILO media en una absorción intracelular de FLUO-BSA-ILO, se realizaron ensayos adicionales usando microscopía confocal de barrido láser. Se incubaron células 16HBE14o- o bien con FLUO-BSA o FLUO-BSA-ILO 0,5  $\mu$ M. La visualización de las células mediante microscopía confocal mostró una clara unión a la superficie celular y posterior absorción intracelular de conjugados de FLUO-BSA-ILO (figura 3C), mientras que ya no pudo observarse ninguna absorción de FLUO-BSA.

#### Caracterización de partículas de vector génico PEI y PEI-g-ILO

Se acopló ILO a PEI a través de química de carbodiimida con un grado de acoplamiento creciente  $F_{ILO} = 2, 5, 8$  o 16 y se midió el tamaño de las partículas de vector génico generadas con dispersión de la luz dinámica (tabla 1). Partículas con un grado de acoplamiento  $F_{ILO} = 2$  y 5 con una razón N/P de 4 a 8 mostraron diámetros hidrodinámicos de 50 bis 100 nm, que eran comparables con los vectores génicos de PEI. Las partículas que se produjeron PEI N/P 2, PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 2$  N/P 2 a 3 y PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 16$  N/P 4, no eran estables y precipitaban. Las partículas que tenían menos de 150 nm mostraron una polidispersidad  $< 0,2$ .

A continuación se determinó la afinidad de unión a ADN de los constructos de PEI-g-ILO. Se produjeron partículas con N/P 4 y se realizó una prueba de liberación de ADN (figura 4). Para PEI, PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 2$  y PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$  había una liberación completa del ADN tras la adición de heparán sulfato. En el caso de un alto grado de acoplamiento de 16 pudo observarse solo una liberación parcial del ADN, lo que apunta a una unión más fuerte de los polímeros al plásmido. Por tanto, un grado de acoplamiento de 16 o más es menos preferible.

#### Eficacia de transfección *in vitro*

Una unión y absorción aumentada de FLUO-BSA-ILO en diferentes células pulmonares y la posibilidad de formar partículas de PEI-g-ILO/pCMV-luc, era motivo para seguir estudiando el ILO como ligando, para mejorar la transferencia genética *in vitro*. Se transfectaron células 16HBE14o- con vectores génicos PEI-g-ILO y se compararon con PEI modificada como control. La eficacia de transferencia genética aumentó con la razón de N/P. El grado máximo de expresión génica se encontraba a N/P 4 y  $F_{ILO} = 5$ . En estas condiciones optimizadas, la expresión génica fue significativamente 46 veces mayor que para PEI (figura 5A). La formación de partículas a razones de N/P mayores ( $> 4$ ) no condujo a ningún aumento adicional de la expresión génica. Conjugados de PEI-g-ILO con otros grados de acoplamiento condujeron a grados de transfección o bien menores o bien iguales en comparación con PEI.

Los ensayos para la inhibición competitiva con CAY10449 se realizaron para confirmar la transferencia genética mediada por receptores de vectores génicos PEI-g-ILO. Se transfectaron células 16HBE14o- o bien con PEI o vectores génicos PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$  con N/P 4 en presencia o ausencia de 150  $\mu$ M CAY10449. La expresión génica observada con PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$  estaba reducida 33 veces significativamente ( $p < 0,01$ ) con respecto a PEI (figura 5B). En el caso de células, que estaban transfectadas con PEI, no se observó ningún efecto por CAY10449.

Además, se sometió a prueba PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$  también en células A549 y BEAS-2B. En condiciones optimizadas, la expresión mediada por PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$  con respecto a PEI en células A549 o BEAS-2B era 45 veces o 14 veces más alta (figura 5C).

#### Estudios para la liberación génica *in vivo*

Se suministraron partículas de vector génico PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$  y PEI al pulmón de ratones BALB/C a través de aerosol y se analizó la expresión génica durante 24 h tras la administración del gen. La medición de la expresión del gen de luciferasa con respecto a la imagen de bioluminiscencia *in vivo* muestra una fuerte señal en los pulmones de ratones, que se habían tratado con vectores génicos PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$ , pero no estaba en el límite de detección para vectores génicos de PEI (figura 6A). Para evaluar cuantitativamente la luciferasa por mg de tejido pulmonar, se sacrificaron los ratones y se aislaron los pulmones. La expresión de luciferasa, que se midió en el tejido pulmonar homogeneizado, era significativamente 14 veces mayor para vectores génicos PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$  que para vectores génicos PEI (figura 6B).

#### Toxicidad *in vitro* e *in vivo*

La viabilidad *in vitro* tras la utilización de partículas de vector génico (PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$ /pCMV-luc o PEI/pCMV-luc) se midió usando un ensayo de MTT. En comparación con la PEI no pudo observarse ningún aumento de la citotoxicidad ( $86,0 \pm 10,1\%$  de viabilidad celular para PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$  con respecto a  $89,2 \pm 3,2\%$  para PEI). Para la determinación de la toxicidad *in vivo* y la inflamación se obtuvo suero de ratones tratados y se midieron las

citocinas inflamatorias, incluyendo interleucina-12 (IL-12) e interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). De manera similar a los resultados de MTT *in vitro* no pudo demostrarse ningún aumento significativo en las citocinas 24 h tras la administración del gen con ELISA.

5 Con los ensayos anteriores pudo mostrarse que el análogo de prostaglandina I<sub>2</sub> ILO, un agonista de receptor IP<sub>1</sub>, puede usarse como ligando de guiado a la diana, para mejorar la transferencia genética de polímeros catiónicos, tal como PEI en células pulmonares *in vitro* e *in vivo*. Se encontró que, con los conjugados según la invención, que contienen un análogo de prostaglandina I<sub>2</sub> como ligando de guiado a la diana y un polímero catiónico como envoltura para una sustancia activa, puede mejorarse significativamente la expresión génica. Así, en el estudio se mostró que la expresión del gen indicador había aumentado significativamente en las células epiteliales alveolares (A549) y bronquiales (16HBE14o-, BEAS-2B) humanas, concretamente en hasta 46 veces. Además, la actividad luciferasa en el pulmón de ratones tras el tratamiento con aerosol era significativamente más alta, concretamente 14 veces más alta que en el caso de PEI.

15 ILO y TRP son agonistas del receptor IP<sub>1</sub> humano [29]. Ambos están autorizados para el tratamiento de hipertensión arterial pulmonar a través de inhalación de aerosol o aplicación intravenosa [20, 30, 31]. Los receptores IP<sub>1</sub> se expresan en el pulmón de seres humanos y ratones [15, 32-34] y los complejos de receptor IP<sub>1</sub>/ligando se internalizan en la célula [35, 36]. Según la invención, estas propiedades se aprovechan para poner a disposición un sistema mejorado para la introducción de agentes en células pulmonares.

20 Con la inmunotransferencia de tipo Western pudo conformarse la expresión de receptores IP<sub>1</sub> en diferentes tipos de células pulmonares. Para caracterizar más detalladamente la expresión de receptor IP<sub>1</sub> sobre la superficie celular de células pulmonares, se sintetizaron conjugados de BSA marcados con fluoresceína, que estaban acoplados o bien a ILO o bien a TRP. Ambos constructos se incubaron entonces con líneas celulares epiteliales alveolares (A549) y bronquiales (16HBE14o-) y se analizó la unión a las células con citometría de flujo. Los resultados muestran que están presentes receptores IP<sub>1</sub> en cada una de las líneas celulares sometidas a prueba. Sin embargo, ILO muestra una mayor unión a la superficie celular que TRP y por tanto se usó ILO como ligando de guiado a la diana en todos los ensayos posteriores. La especificidad de la unión del receptor IP<sub>1</sub> se mostró mediante ensayos de inhibición con el antagonista de receptor IP<sub>1</sub> específico CAY10449 [27, 28, 32] y mediante el exceso de ILO libre.

30 Para confirmar estas observaciones, se realizó una microscopía confocal de barrido láser, que mostraba la unión de FLUO-BSA-ILO a la superficie celular y la absorción intracelular en células 16HBE14o-. Por tanto, estos resultados demuestran que puede usarse ILO como ligando de guiado a la diana según la invención, que media en la unión y absorción intracelular de sustancias conjugadas, tal como FLUO-BSA, lo que es una condición previa para una absorción mediada por receptores de nanopartículas de vector génico.

35 Para estudios de transfección se conjugó ILO con PEI ramificado de 25 kDa a través de un enlace amida. La síntesis condujo a conjugados con un grado de acoplamiento de F<sub>ILO</sub> = 2, 5, 8 y 16. Se examinaron partículas de PEI-g-ILO/pCMV-luc para determinar células 16HBE14o- y se observó la máxima eficacia de transfección a N/P 4 F<sub>ILO</sub> = 5, mientras que un mayor grado de acoplamiento de desde 8 hasta 16 condujo a una tasa de transfección menor. Esto puede basarse en una liberación incompleta de pCMV-luc a grados de acoplamiento mayores, lo que se observó con una prueba de liberación de ADN. La liberación de pADN a partir de partículas de PEI/p-ADN se estableció ya como parámetro crítico para una transferencia genética satisfactoria [37]. Puede especularse, que una interacción hidrófoba adicional de ILO con pADN podría aumentar la unión a pADN. La medición del tamaño de diferentes partículas mostró que una cantidad creciente de ligando conduce a diámetros hidrodinámicos mayores para partículas de PEI-g-ILO/pCMV-luc de hasta 1  $\mu$ m. Resultados similares se obtuvieron en Elfinger *et al.*, cuando se acopló clenbuterol a PEI [13]. Partículas con PEI-g-ILO F<sub>ILO</sub> = 5 mostraron un diámetro hidrodinámico de menos de 100 nm. Partículas de tamaño similar pudieron internalizarse de manera más eficaz que las partículas mayores, lo que ya se mostró [38]. La transfección de células epiteliales alveolares (A549) y bronquiales (16HBE14o-, BEAS-2B) con partículas de PEI-g-ILO F<sub>ILO</sub> = 5/pCMV-luc con N/P 4 condujo a un aumento de 46 veces de la expresión del gen indicador en comparación con partículas de PEI/pCMV-luc con una razón de N/P igual en todas las líneas celulares sometidas a prueba. La expresión génica mejorada observada no condujo a un aumento elevado de la toxicidad metabólica, lo que se midió con una prueba de MTT. Además, se respaldó adicionalmente la hipótesis de la transferencia genética mediada por receptor mediante los ensayos con una inhibición mediada por antagonistas específicos en células 16HBE14o-. La adición de CAY10449 redujo la expresión génica hasta una medida, que es comparable con PEI.

55 Para ensayos con animales se usó un plásmido de expresión de luciferasa libre de CpG (pCpG-luc). Se ha demostrado que los plásmidos libres de CpG tienen un efecto menos inflamatorio que los que contienen CpG. También se mostró que conducen a una expresión génica mayor y más prolongada en el pulmón [39]. Antes de los ensayos con animales se nebulizaron vectores génicos de PEI-g-ILO F<sub>ILO</sub> = 5/pCpG-luc y PEI/pCpG-luc y se acumularon diferentes fracciones (nebulizadas, no nebulizadas), para someter a prueba la estabilidad de las partículas. Ni la prueba de retardo en gel ni las mediciones del tamaño de partícula mostraron una variación de las partículas tras la nebulización en comparación con las partículas no nebulizadas. Estas observaciones confirman que las partículas no se vieron afectadas negativamente por la formación del aerosol. Ya se notificaron los mismos resultados [40]. Tras la administración del aerosol a los pulmones de ratones, la expresión génica era significativamente, 14 veces, mayor para vectores génicos PEI-g-ILO F<sub>ILO</sub> = 5/pCpG-luc que para PEI/pCpG-luc. La

medición de interleucina-12 (IL-12) e interferón- $\gamma$  (INF- $\gamma$ ) en suero de ratón no mostró ningún aumento significativo de estas citocinas. Esta observación coincide con Gautham *et al.* [41], donde se mostró que la administración en aerosol de partículas de PEI-ADN no induce ninguna respuesta de citocina.

- 5 Resumiendo, puede establecerse que según la invención se proporciona una nueva estructura de hallazgo de diana para el suministro de sustancias al pulmón. El potencial de los análogos de prostaciclina y en particular de ILO como ligando para el guiado a la diana se reconoció por parte de los inventores y se aprovechó como "vía" para la administración de sustancias en células pulmonares. En particular son útiles análogos de prostaciclina ILO como ligandos de guiado a la diana para vectores no virales en forma de aerosol. Usando conjugados moleculares a base de fluoresceína pudo mostrarse que el receptor IP<sub>1</sub> es un candidato adecuado para una transferencia genética
- 10 mediada por receptor en células pulmonares. La unión y absorción específica del receptor de conjugados moleculares pudo mostrarse para células epiteliales tanto alveolares como bronquiales y células Clara. Los conjugados según la invención conducen a un aumento significativo específico de la expresión génica *in vitro* e *in vivo*. Mediante el aumento de más de 10 veces de la expresión génica es posible reducir la cantidad de pADN y de portadores genéticos, lo que reduce la toxicidad e inflamación mediada por ADN o portadores.
- 15 Los resultados de este ejemplo se muestran en las figuras 1 a 7 y la tabla 1:

Tabla 1: Caracterización física de vectores génicos de PEI/pCMV-luc y PEI-g-ILO/pCMV-luc usando PEI-g-ILO con diferentes grados de acoplamiento ( $F_{ILO} = 2, 5, 8, 16$ ) a diferentes razones de N/P:

Mediciones del tamaño de partícula y de la polidispersidad (entre paréntesis). Los resultados se indican como valor medio  $\pm$  desviación estándar ( $n = 3$ ).

20 Figura 1

La inmunotransferencia de tipo Western muestra la expresión de proteína receptora IP<sub>1</sub> con 67 kDa en células epiteliales alveolares (A549) y bronquiales (BEAS-2B, 16HBE14o-) humanas. Cada banda se cargó con 40  $\mu$ g de extracto proteico.

Figura 2

- 25 Hallazgo de diana del receptor IP<sub>1</sub> con TRP e ILO en líneas celulares epiteliales alveolares (A549) y bronquiales (16HBE14o-). La incubación de FLUO-BSA, FLUO-BSA-TRP y FLUO-BSA-ILO se realizó con una concentración de 0,5  $\mu$ M ( $n = 4$ ): mediciones de FACS. Los resultados se indican como valor medio  $\pm$  desviación estándar. \*\* significa significancia estática con  $p < 0,01$ .

Figura 3

- 30 Distribución de receptor IP<sub>1</sub> y la unión a receptor en células epiteliales alveolares (A549), broncoalveolares (H441) y bronquiales (16HBE14o-, BEAS-2B). La incubación con FLUO-BSA-ILO y FLUO-BSA se realizó con una concentración de 0,5  $\mu$ M ( $n = 4$ ): mediciones de FACS (a). Se incubaron células 16HBE14o- (b,c) y A549 (d) con FLUO-BSA-ILO y FLUO-BSA 25 nM junto con concentraciones crecientes de CAY10449 ( $n = 4$ ); mediciones de FACS (b,c,d). Para la microscopía confocal de barrido láser se incubaron células 16HBE14o- con FLUO-BSA-ILO y
- 35 FLUO-BSA 0,5  $\mu$ M (e). Los resultados se indican como valor medio  $\pm$  desviación estándar. \*\* significa significancia estadística con  $p < 0,01$ .

Figura 4

- 40 Prueba de retardo de ADN para PEI y diferentes constructos de PEI-g-ILO con N/P = 4. Se incubaron polímeros, que se habían complejado con pCMV-luc, con (+) y sin (-) heparán sulfato, se repartieron sobre gel de agarosa y se hicieron visibles bajo luz UV tras la tinción con bromuro de etidio.

Figura 5

- Eficacia de transfección *in vitro*. La transfección de células 16HBE14o- con pCMV-luc complejado con diferentes constructos de PEI-g-ILO a diferentes razones de N/P ( $n = 4$ ): medición de la expresión génica de luciferasa (a), experimento de inhibición de partículas de PEI/pCMV-luc y PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$ /pCMV-luc con una razón de N/P de 4 con CAY10449 ( $n = 3$ ): medición de la expresión génica de luciferasa (b). Transfección de A549, 16HBE14o- y BEAS-2B con PEI/pCMV-luc y PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$ /pCMV-luc con una razón de N/P de 4 ( $n = 6$ ): medición de la expresión génica de luciferasa (c). La expresión génica de luciferasa se midió como la luminiscencia en unidades luminosas relativas (RLU) durante 10 s/mg de proteína celular. Los resultados se indican como valor medio  $\pm$  desviación estándar. \*\* significa significancia estadística con  $p < 0,01$ .

50 Figura 6

La expresión génica de luciferasa *in vivo*, que se obtuvo con partículas de PEI/pCpG-luc y PEI-g-ILO  $F_{ILO}=5$ /pCpG-luc con una razón de N/P = 4 en pulmones de ratones BALB/c tras la administración en aerosol ( $n = 5$ ). Los

formadores de bioluminiscencia con un tiempo de exposición de 10 min tras 24 h (a). La medición de la expresión de luciferasa en homogeneizados pulmonares de ratones con un tiempo de exposición de 30 s se realizó 24 h tras la transfección (b). Los resultados se indican como punto vertical con mediana. \*\* significa significancia estadística con  $p < 0,01$ .

## 5 Figura 7

La transfección de células epiteliales alveolares (A549) y bronquiales (16HBE14o-), BEAS-2B) con partículas de PEI-g-ILO  $F_{ILO}=5$ /pCMV-luc con N/P 4 no condujo en comparación con las partículas de PEI/pCMV-luc o en comparación con células no tratadas a un aumento de la toxicidad metabólica, lo que se midió con una prueba de MTT (a). Además, tras la administración de PEI-g-ILO  $F_{ILO}=10$  a los pulmones de ratones en comparación con la administración de PEI y ratones no tratados se midieron interleucina-12 (IL-12) e interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) en el suero de ratón. No se mostró ningún aumento significativo de estas citocinas.

## Ejemplo 2

Suministro de vectores génicos de forma dosis-dependientes a células pulmonares

Se transfectaron células 16HBE14o- con partículas de vector génico de PEI y PEI-g-ILO, reduciendo la cantidad de pCMV-luc desde 1  $\mu$ g hasta 0,25  $\mu$ g (figura 8). 24 h tras la transfección disminuyó la eficacia de transferencia genética de un modo dependiente de la dosis. El mayor grado de expresión génica se halló con 1  $\mu$ g de pCMV-luc. Sin embargo, 0,5  $\mu$ g de pCMV-luc complejado con PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$  condujeron a una expresión, que era igual a 1  $\mu$ g de pCMV-luc complejado con PEI modificada ( $3,3 \cdot 10^5$  con respecto a  $3,2 \cdot 10^5$  RLU/10 s/mg de proteína).

Para mostrar que la eficacia de transferencia genética disminuye de una manera dependiente de la dosis, se realizó un ensayo de transfección, en el que se redujo la cantidad de partículas de vector génico. En este caso se mostró que la reducción de partículas de vector génico de PEI-g-ILO  $F_{ILO} = 5$  hasta el 50% conduce a una expresión igual en comparación con el 100% de partículas de vector génico de PEI. Estos datos muestran claramente que puede reducirse la cantidad de pADN y portadores genéticos y se mantiene el mismo grado de expresión. Además, puede reducirse tanto pADN como la toxicidad e inflamación mediada por portadores.

Los resultados de este ejemplo se representan también en la figura 8.

A continuación se indican las citas bibliográficas, a las que se hace referencia en la descripción.

1. Gill DR, Davies LA, Pringle IA, Hyde SC. The development of gene therapy for diseases of the lung. *Cell Mol Life Sci.* febrero de 2004;61(3):355-68.
2. Gurunathan S, Klinman DM, Seder RA. DNA vaccines: immunology, application, and optimization\*. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:927-74.
3. Davies L, Hyde, SC y Gill, DR Plasmid inhalation: delivery to the airways; 2005.
4. Rudolph C, Schillinger U, Ortiz A, Plank C, Golas MM, Sander B, *et al.* Aerosolized nanogram quantities of plasmid DNA mediate highly efficient gene delivery to mouse airway epithelium. *Mol Ther.* septiembre de 2005;12(3):493-501.
5. Canonico AE, Conary JT, Meyrick BO, Brigham KL. Aerosol and intravenous transfection of human alpha 1-antitrypsin gene to lungs of rabbits. *Am J Respir Cell Mol Biol.* enero de 1994;10(1):24-9.
6. McLachlan G, Baker A, Tennant P, Gordon C, Vrettou C, Renwick L, *et al.* Optimizing aerosol gene delivery and expression in the ovine lung. *Mol Ther.* febrero de 2007;15(2):348-54.
7. Alton EW, Stern M, Farley R, Jaffe A, Chadwick SL, Phillips J, *et al.* Cationic lipid-mediated CFTR gene transfer to the lungs and nose of patients with cystic fibrosis: a double-blind placebo-controlled trial. *Lancet.* 20 de marzo de 1999;353(9157):947-54.
8. Boussif O, Lezoualc'h F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, *et al.* A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1 de agosto de 1995;92(16):7297-301.
9. Dunlap DD, Maggi A, Soria MR, Monaco L. Nanoscopic structure of DNA condensed for gene delivery. *Nucleic Acids Res.* 1 de agosto de 1997;25(15):3095-101.
10. Kircheis R, Kichler A, Wallner G, Kursa M, Ogris M, Felzmann T, *et al.* Coupling of cell-binding ligands to polyethylenimine for targeted gene delivery. *Gene Ther.* mayo de 1997;4(5):409-18.
11. Chul Cho K, Hoon Jeong J, Jung Chung H, Joe CO, Wan Kim S, Gwan Park T. Folate receptor-mediated intracellular delivery of recombinant caspase-3 for inducing apoptosis. *J Control Release.* 2 de noviembre de 2005;108(1):121-31.

12. Elfinger M, Maucksch C, Rudolph C. Characterization of lactoferrin as a targeting ligand for nonviral gene delivery to airway epithelial cells. *Biomaterials*. agosto de 2007;28(23):3448-55.
13. Elfinger M, Geiger J, Hasenpusch G, Uzgun S, Sieverling N, Aneja MK, *et al.* Targeting of the beta(2)-adrenoceptor increases nonviral gene delivery to pulmonary epithelial cells in vitro and lungs in vivo. *J Control Release*. 5 de mayo de 2009;135(3):234-41.
14. Blessing T, Kursa M, Holzhauser R, Kircheis R, Wagner E. Different strategies for formation of pegylated EGF-conjugated PEI/DNA complexes for targeted gene delivery. *Bioconjug Chem*. julio-agosto de 2001;12(4):529-37.
15. Coleman RA, Smith WL, Narumiya S. International Union of Pharmacology classification of prostanoid receptors: properties, distribution, and structure of the receptors and their subtypes. *Pharmacol Rev*. junio de 1994;46(2):205-29.
16. Narumiya S, Sugimoto Y, Ushikubi F. Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev*. octubre de 1999;79(4):1193-226.
17. Stitham J, Arehart EJ, Gleim SR, Douville KL, Hwa J. Human prostacyclin receptor structure and function from naturally-occurring and synthetic mutations. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. enero de 2007;82(1-4):95-108.
18. Clark RB, Knoll BJ, Barber R. Partial agonists and G protein-coupled receptor desensitization. *Trends Pharmacol Sci*. julio de 1999;20(7):279-86.
19. Ferguson SS. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*. marzo de 2001;53(1):1-24.
20. Strauss WL, Edelman JD. Prostanoid therapy for pulmonary arterial hypertension. *Clin Chest Med*. marzo de 2007;28(1):127-42; ix.
21. Snyder SL, Sobocinski PZ. An improved 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid method for the determination of amines. *Anal Biochem*. marzo de 1975;64(1):284-8.
22. Ungaro F, De Rosa G, Miro A, Quaglia F. Spectrophotometric determination of polyethylenimine in the presence of an oligonucleotide for the characterization of controlled release formulations. *J Pharm Biomed Anal*. 5 de febrero de 2003;31(1):143-9.
23. Huth S, Lausier J, Gersting SW, Rudolph C, Plank C, Welsch U, *et al.* Insights into the mechanism of magnetofection using PEI-based magnetofectins for gene transfer. *J Gene Med*. agosto de 2004;6(8):923-36.
24. Rudolph C, Ortiz A, Schillinger U, Jauernig J, Plank C, Rosenecker J. Methodological optimization of polyethylenimine (PEI)-based gene delivery to the lungs of mice via aerosol application. *J Gene Med*. enero de 2005;7(1):59-66.
25. Buckley SM, Howe SJ, Rahim AA, Buning H, McIntosh J, Wong SP, *et al.* Luciferin detection after intranasal vector delivery is improved by intranasal rather than intraperitoneal luciferin administration. *Hum Gene Ther*. octubre de 2008;19(10):1050-6.
26. Zhang Z, Austin SC, Smyth EM. Glycosylation of the human prostacyclin receptor: role in ligand binding and signal transduction. *Mol Pharmacol*. septiembre de 2001;60(3):480-7.
27. Bley KR, Bhattacharya A, Daniels DV, Gever J, Jahangir A, O'Yang C, *et al.* RO1138452 and RO3244794: characterization of structurally distinct, potent and selective IP (prostacyclin) receptor antagonists. *Br J Pharmacol*. febrero de 2006;147(3):335-45.
28. Clark RD, Jahangir A, Severance D, Salazar R, Chang T, Chang D, *et al.* Discovery and SAR development of 2-(phenylamino) imidazolines as prostacyclin receptor antagonists [corrected]. *Bioorg Med Chem Lett*. 23 de febrero de 2004;14(4):1053-6.
29. Olschewski H, Rose F, Schermuly R, Ghofrani HA, Enke B, Olschewski A, *et al.* Prostacyclin and its analogues in the treatment of pulmonary hypertension. *Pharmacol Ther*. mayo de 2004;102(2):139-53.
30. Skoro-Sajer N, Lang I. Treprostinil for the treatment of pulmonary hypertension. *Expert Opin Pharmacother*. junio de 2008;9(8):1415-20.
31. Krug S, Sablotzki A, Hammerschmidt S, Wirtz H, Seyfarth HJ. Inhaled iloprost for the control of pulmonary hypertension. *Vasc Health Risk Manag*. 2009;5(1):465-74.
32. Ayer LM, Wilson SM, Traves SL, Proud D, Giembycz MA. 4,5-Dihydro-1H-imidazol-2-yl-[4-(4-isopropoxy-benzyl)-phenyl]-amine (R01138452) is a selective, pseudo-irreversible orthosteric antagonist at the prostacyclin (IP)-receptor expressed by human airway epithelial cells: IP-receptor-mediated inhibition of CXCL9 and CXCL10 release. *J*

Pharmacol Exp Ther. febrero de 2008;324(2):815-26.

33. Boie Y, Rushmore TH, Darmon-Goodwin A, Grygorczyk R, Slipetz DM, Metters KM, *et al.* Cloning and expression of a cDNA for the human prostanoid IP receptor. *J Biol Chem.* 22 de abril de 1994;269(16):12173-8.
- 5 34. Namba T, Oida H, Sugimoto Y, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A, *et al.* cDNA cloning of a mouse prostacyclin receptor. Multiple signaling pathways and expression in thymic medulla. *J Biol Chem.* 1 de abril de 1994;269(13):9986-92.
35. Giovanazzi S, Accomazzo MR, Letari O, Oliva D, Nicosia S. Internalization and down-regulation of the prostacyclin receptor in human platelets. *Biochem J.* 1 de julio de 1997;325 (Pt 1):71-7.
- 10 36. Smyth EM, Austin SC, Reilly MP, FitzGerald GA. Internalization and sequestration of the human prostacyclin receptor. *J Biol Chem.* 13 de octubre de 2000;275(41):32037-45.
37. Huth S, Hoffmann F, von Gersdorff K, Laner A, Reinhardt D, Rosenecker J, *et al.* Interaction of polyamine gene vectors with RNA leads to the dissociation of plasmid DNA-carrier complexes. *J Gene Med.* diciembre de 2006;8(12):1416-24.
- 15 38. Rejman J, Oberle V, Zuhorn IS, Hoekstra D. Sizedependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem J.* 1 de enero de 2004;377(Pt 1):159-69.
39. Hyde SC, Pringle IA, Abdullah S, Lawton AE, Davies LA, Varathalingam A, *et al.* CpG-free plasmids confer reduced inflammation and sustained pulmonary gene expression. *Nat Biotechnol.* mayo de 2008;26(5):549-51.
40. Rudolph C, Muller RH, Rosenecker J. Jet nebulization of PEI/DNA polyplexes: physical stability and in vitro gene delivery efficiency. *J Gene Med.* enero-febrero de 2002;4(1):66-74.
- 20 41. Gautam A, Densmore CL, Waldrep JC. Pulmonary cytokine responses associated with PEI-DNA aerosol gene therapy. *Gene Ther.* febrero de 2001;8(3):254-7.

**REIVINDICACIONES**

- 5 1. Conjugado a partir de un complejo de agente y al menos un ligando de hallazgo de diana, comprendiendo el complejo de agente un agente envuelto por un material de envoltura, siendo el ligando de hallazgo de diana iloprost o treprostnil, siendo el material de envoltura un polímero catiónico y siendo el agente un ácido nucleico.
2. Conjugado según la reivindicación 1, caracterizado porque el ácido nucleico es un ADN o ARN, cuya falta o deficiencia provoca una enfermedad o es un ADN o ARN, que codifica para un polipéptido, cuya falta o deficiencia provoca una enfermedad o que actúa de manera inmunomoduladora.
- 10 3. Conjugado según la reivindicación 1 o 2, caracterizado porque el agente es un ácido nucleico que compensa un defecto proteico o una falta de proteína o una mezcla del ácido nucleico y una proteína que compensa un defecto proteico o una falta de proteína o fármaco que actúa en el pulmón.
4. Conjugado según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el agente es una molécula indicadora.
- 15 5. Conjugado según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el material de envoltura es una sustancia que aparece de manera natural o sintética.
6. Conjugado según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el material de envoltura es un polímero catiónico, preferiblemente protonable, que contiene nitrógeno que puede degradarse biológicamente, en particular polietilenimina o polietilenimina biodegradable.
- 20 7. Conjugado según una de las reivindicaciones anteriores, caracterizado porque el complejo de agente de material de envoltura y ácido nucleico está pegilado adicionalmente.
8. Conjugado según una de las reivindicaciones anteriores para su uso para la terapia génica o para su uso para el tratamiento de una enfermedad pulmonar que se basa en un defecto proteico o defecto genético, en particular de fibrosis quística.
- 25 9. Conjugado según una de las reivindicaciones 2 a 7 o conjugado para su uso según la reivindicación 8, caracterizado porque la razón de polímero catiónico con respecto a ácido nucleico, medida como razón molar de porcentaje de nitrógeno del polímero con respecto a porcentaje de fosfato del ADN, se encuentra en un intervalo de desde 10:1 hasta 1:20.
- 30 10. Conjugado según una de las reivindicaciones 1 a 7 y 9 o conjugado para su uso según la reivindicación 8 o 9, caracterizado porque el agente envuelto por el material de envoltura se encuentra en forma de nanocápsulas o nanopartículas.
11. Conjugado según una de las reivindicaciones 1 a 7, 9 y 10 para su uso para el tratamiento de enfermedades pulmonares, posibilitando iloprost o treprostnil como estructura de hallazgo de diana la transferencia del agente a células epiteliales alveolares y bronquiales.
- 35 12. Composición terapéutica para el tratamiento de afecciones pulmonares que contiene un conjugado según una de las reivindicaciones 1 a 7, 9 y 10.

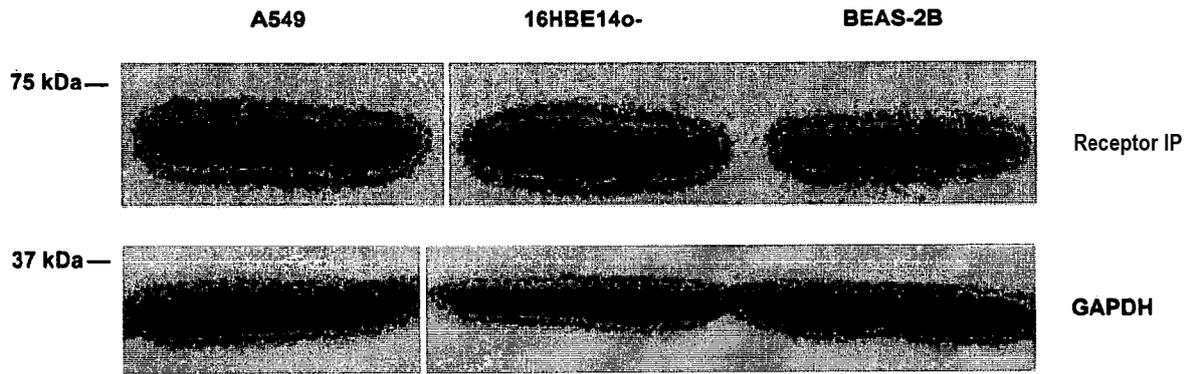


Fig. 1

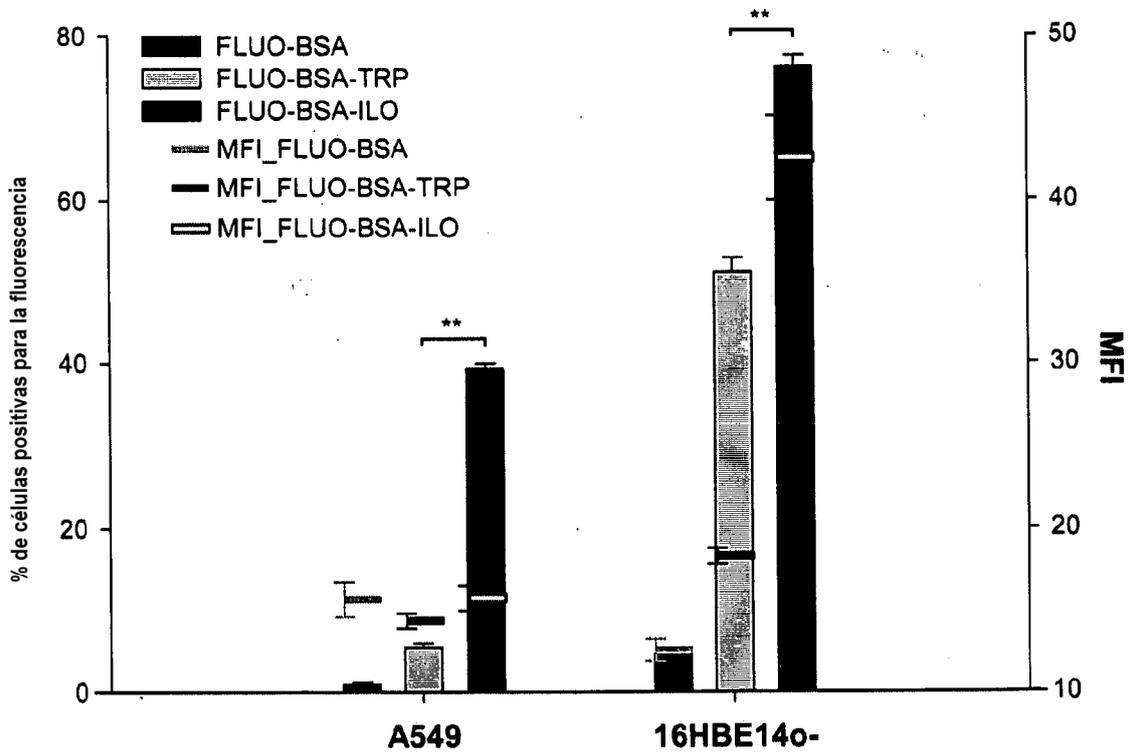


Fig. 2

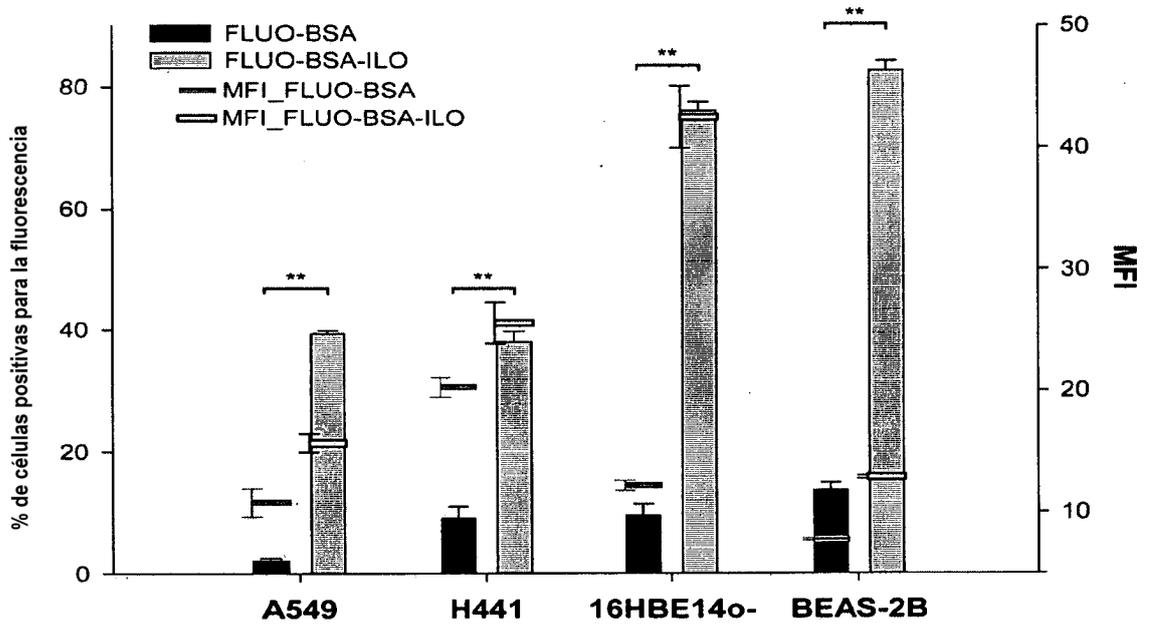


Fig. 3a

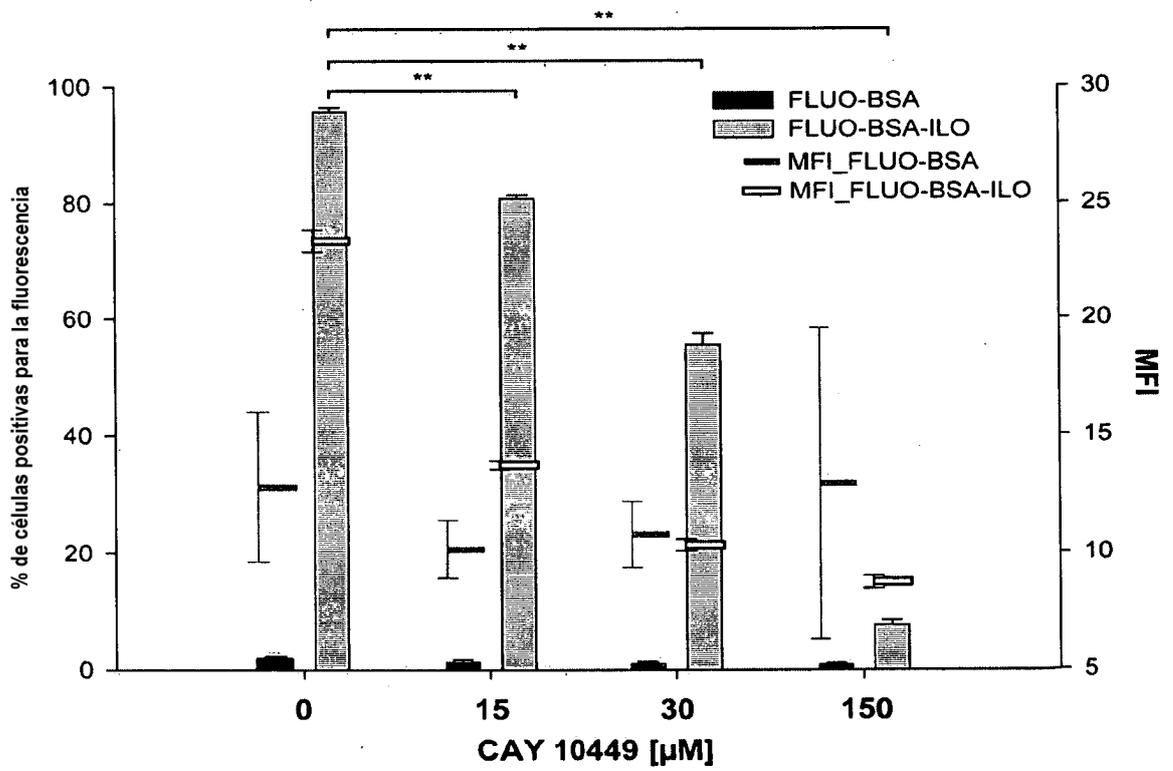


Fig. 3b

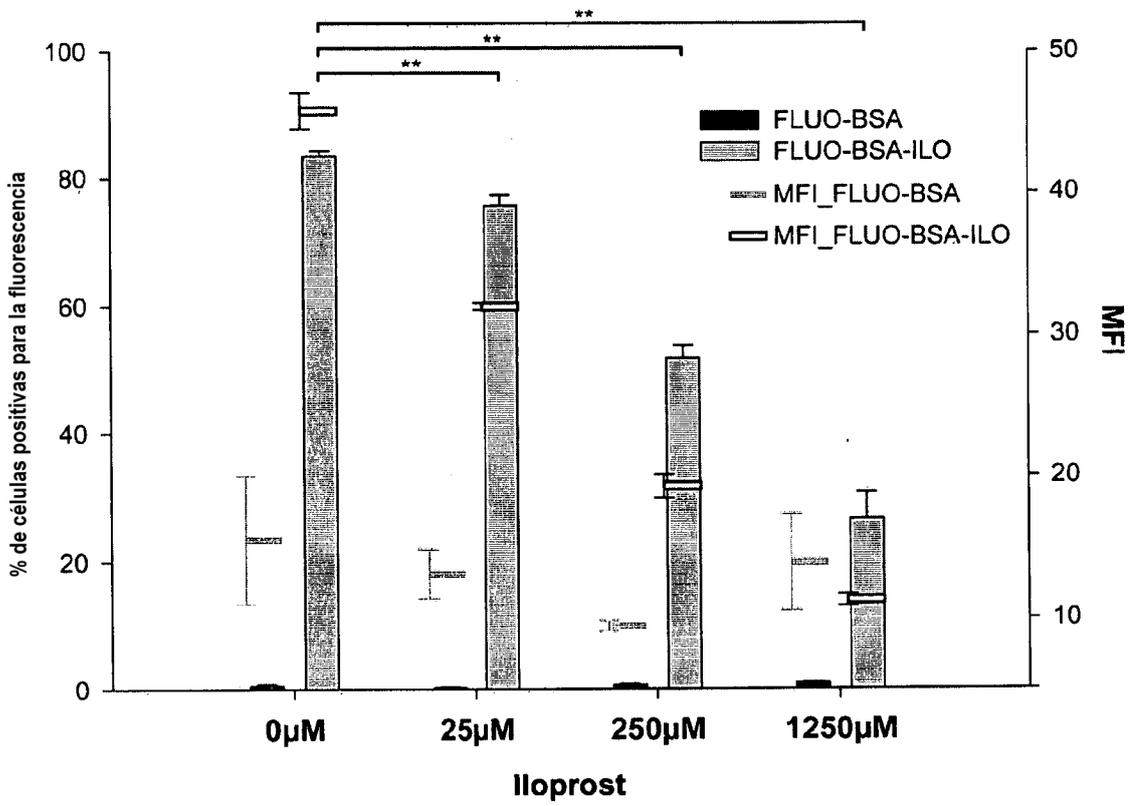


Figura 3c

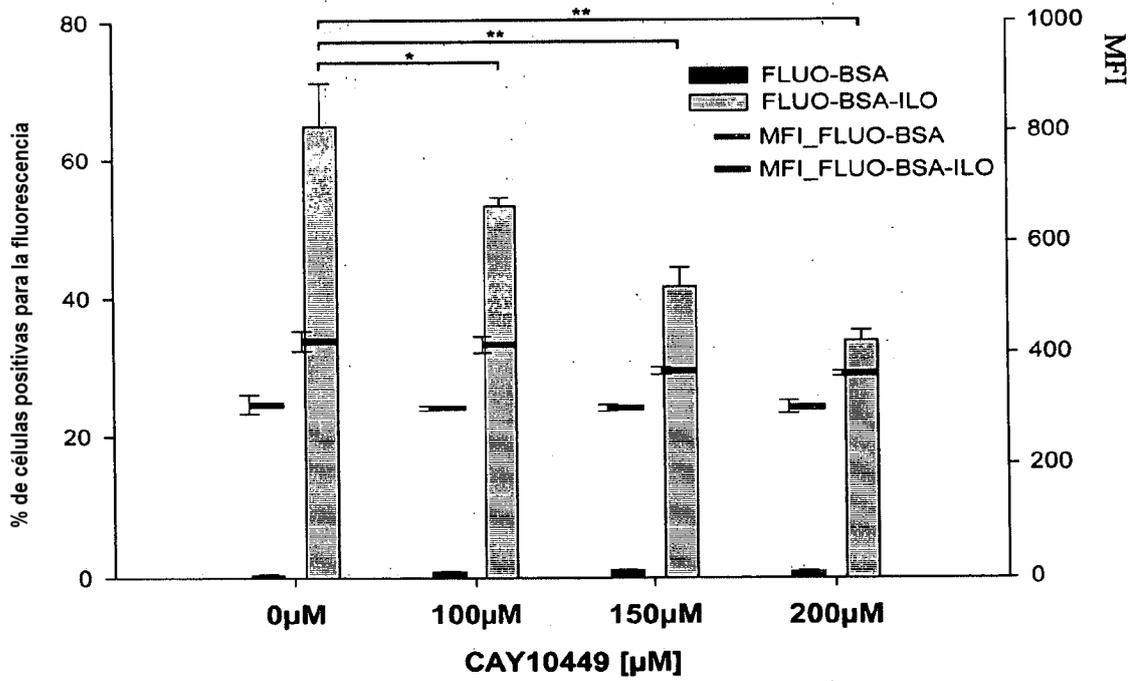


Fig. 3d

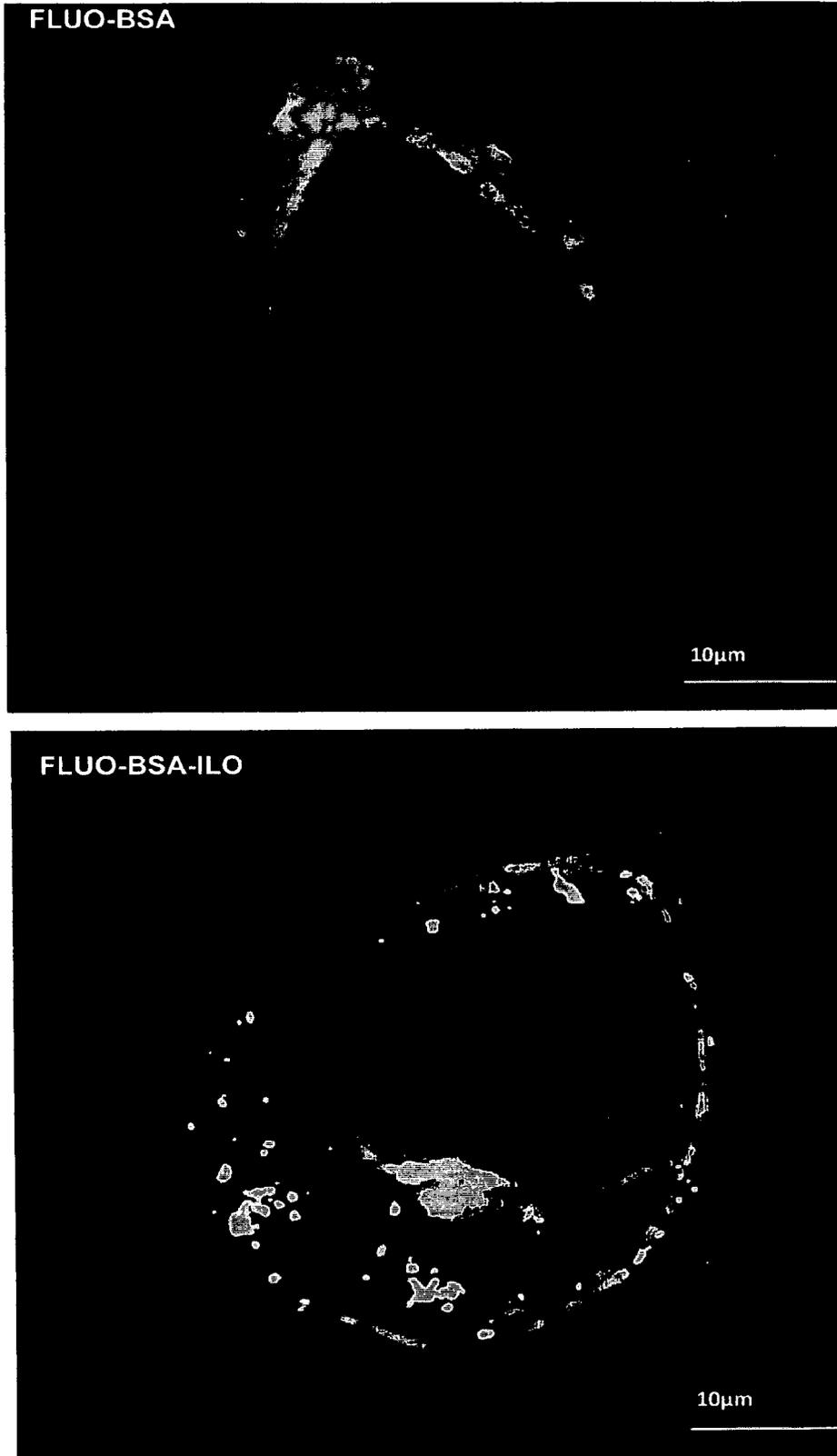


Fig. 3e

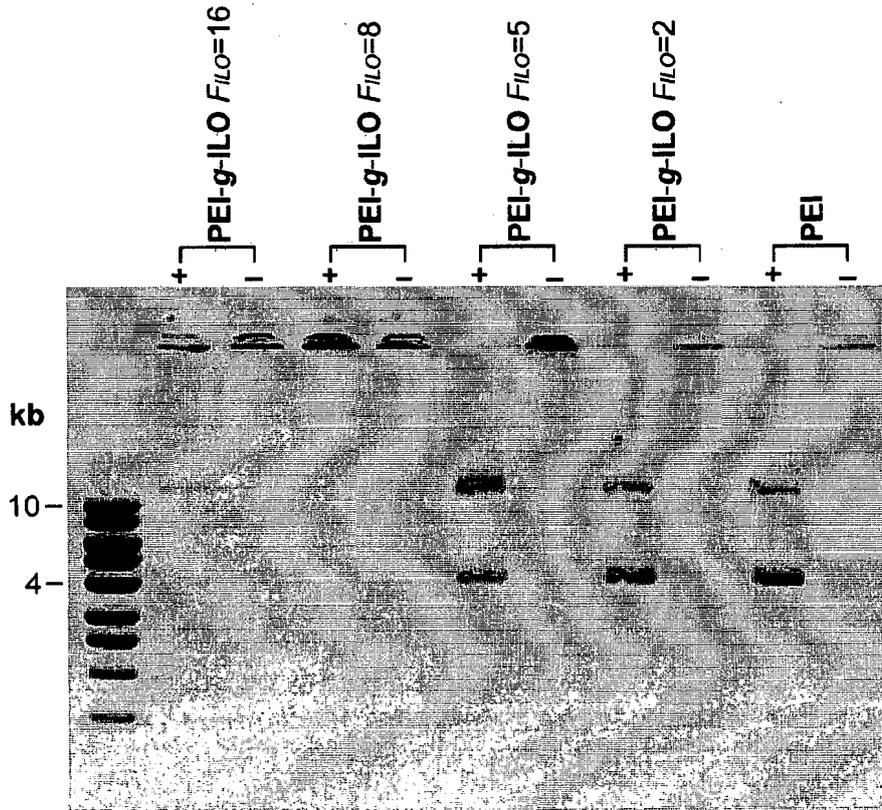


Fig. 4

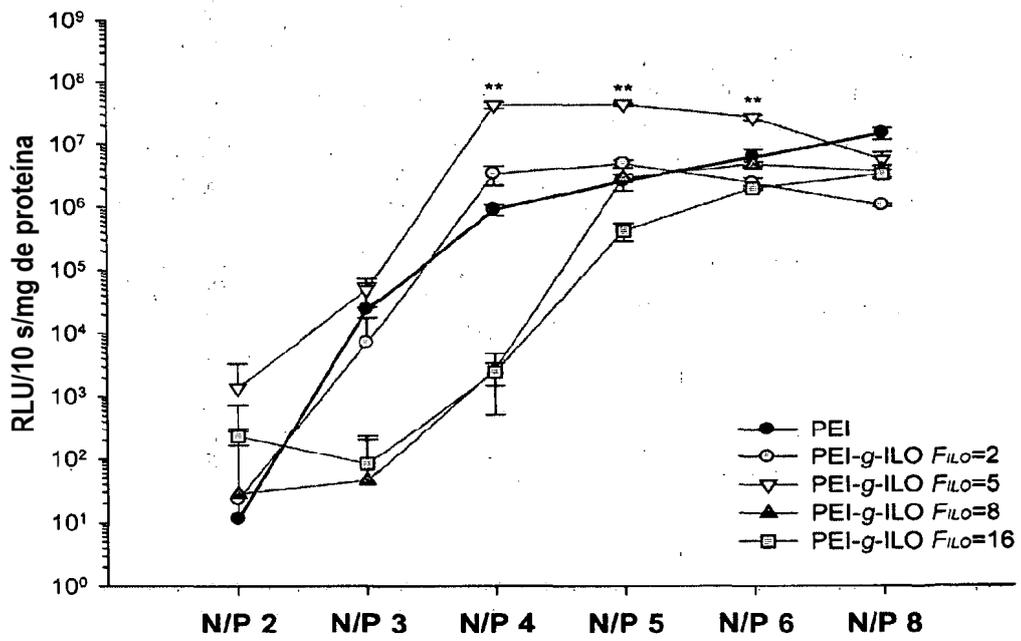


Fig. 5a

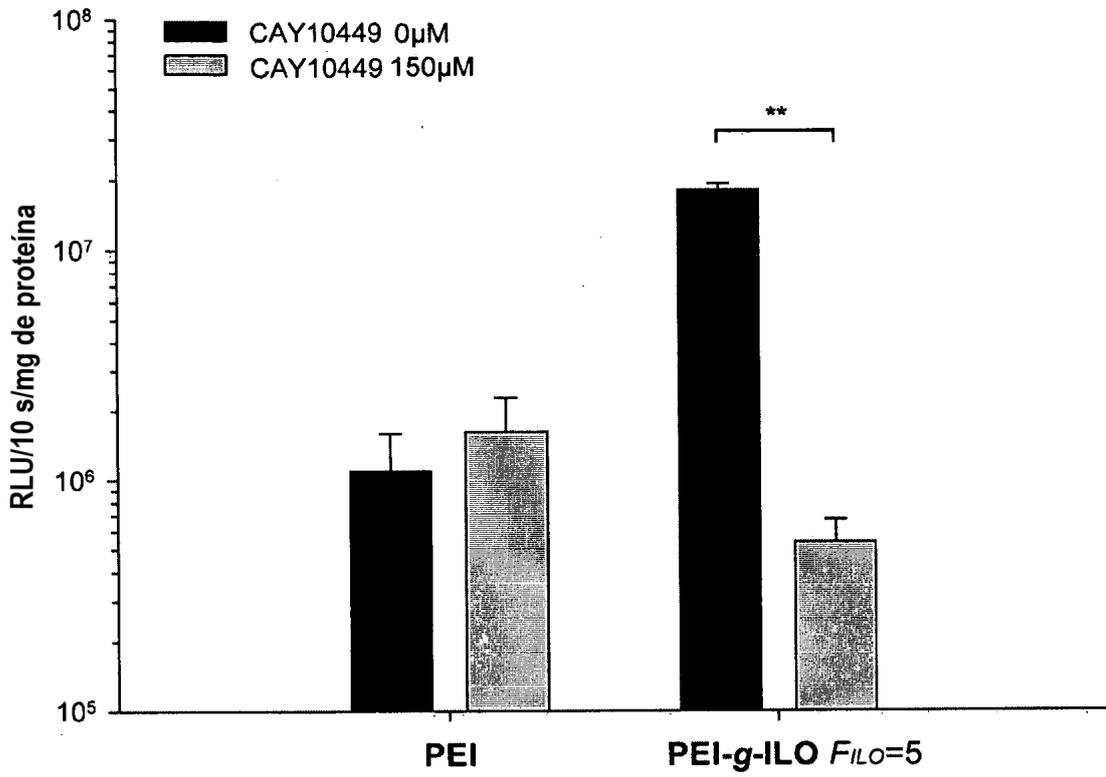


Fig. 5b

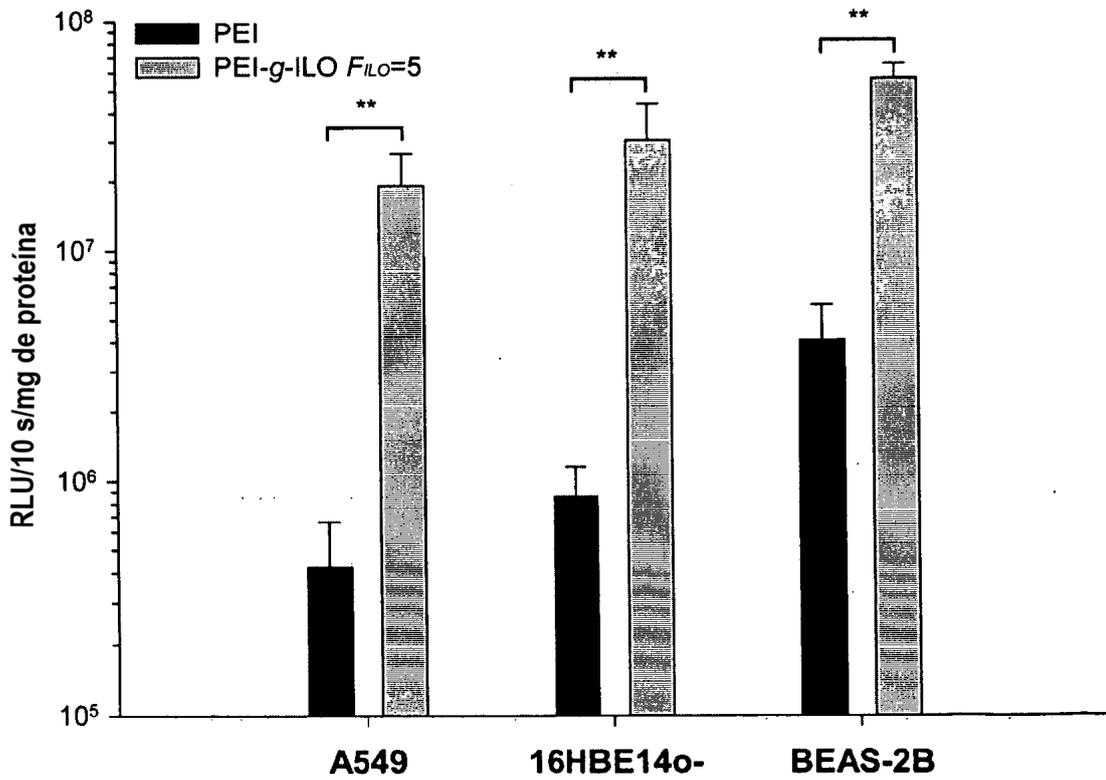


Fig. 5c

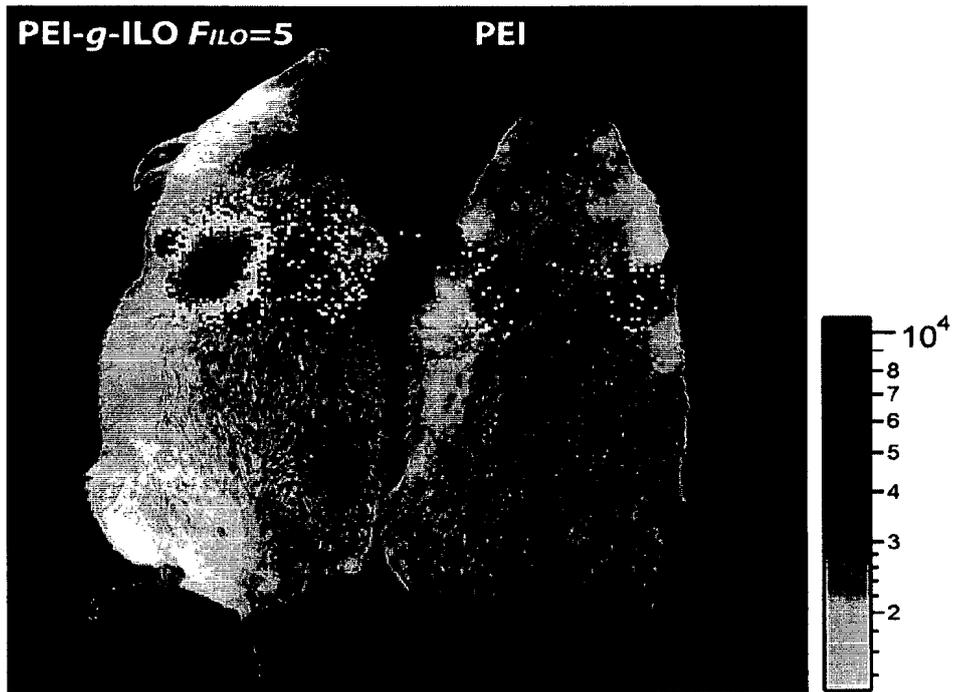


Fig. 6a

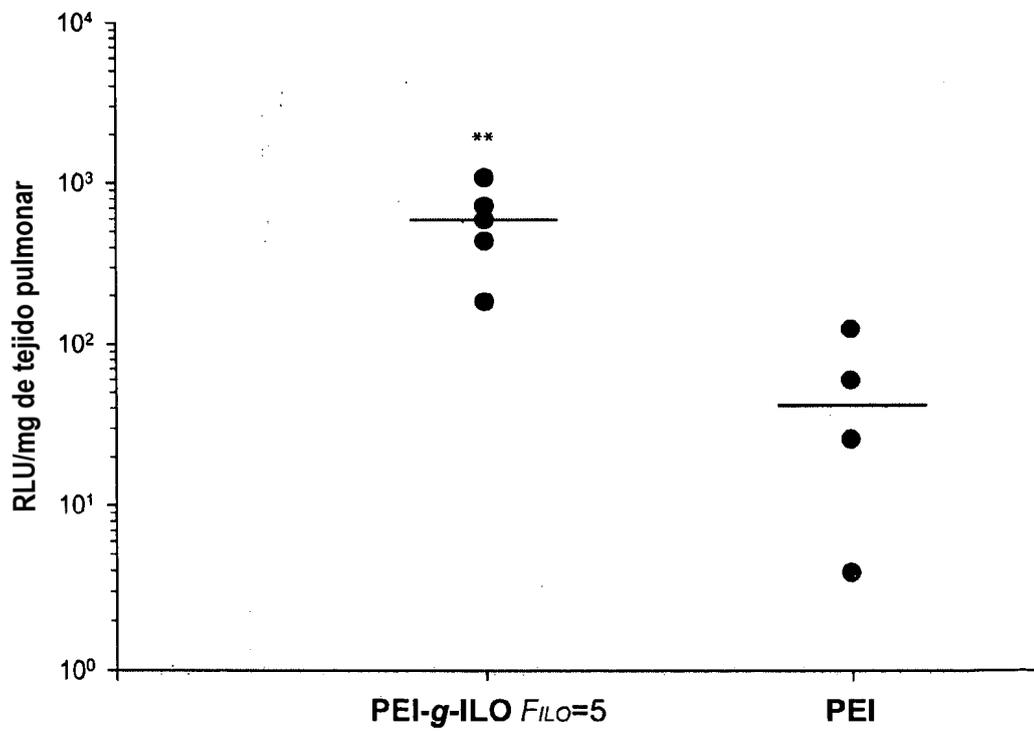


Fig. 6b

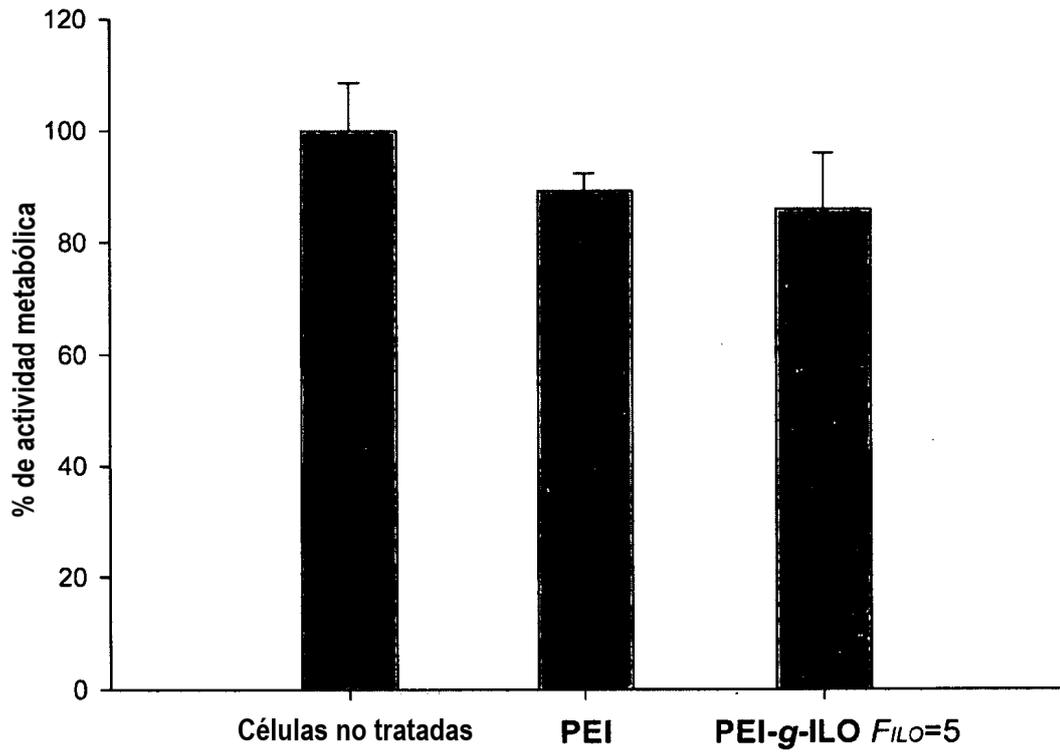


Fig. 7a

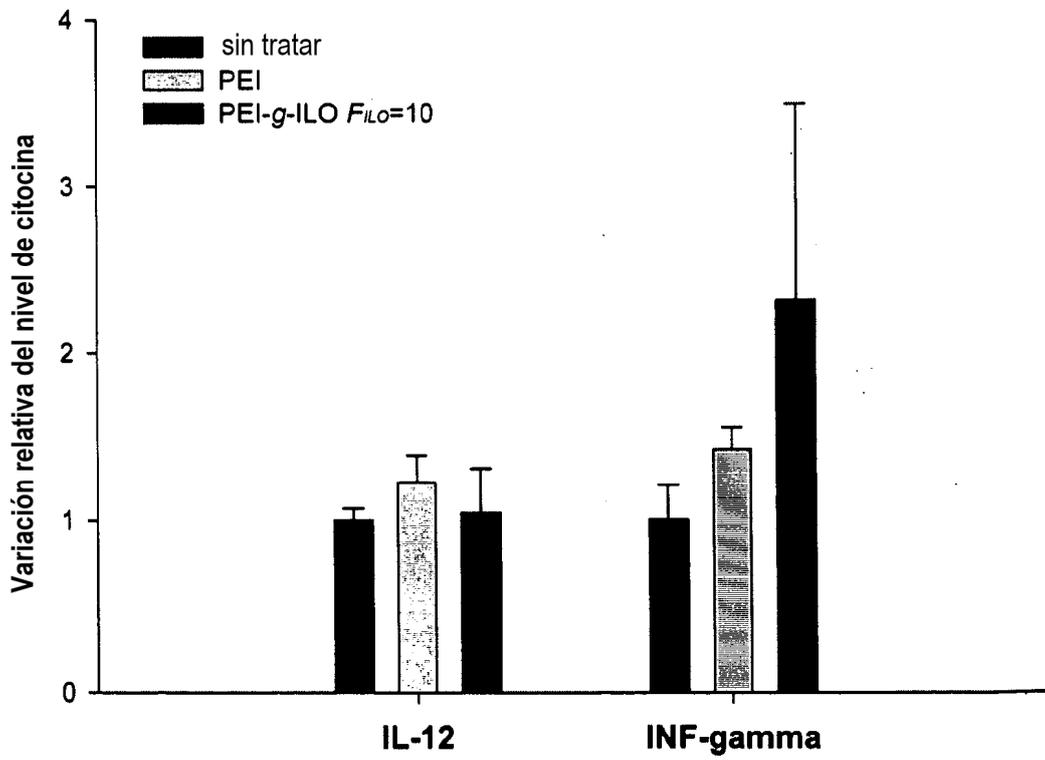


Fig. 7b

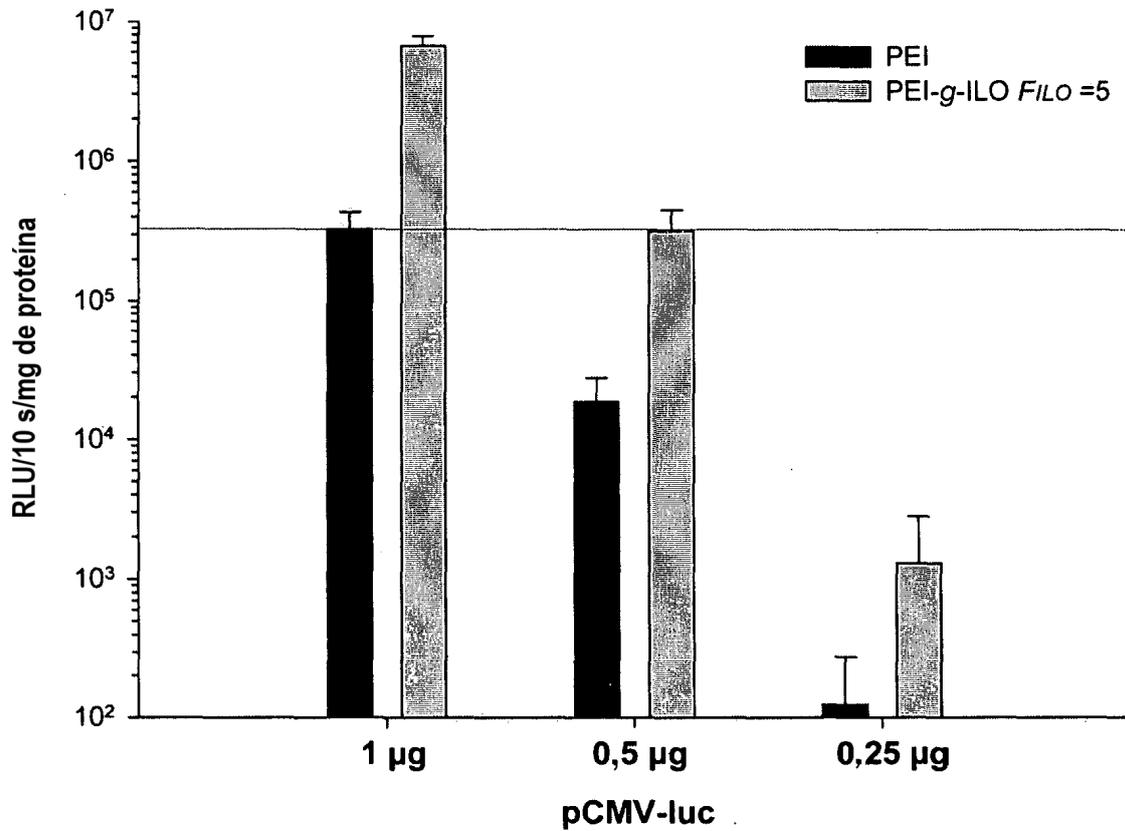


Fig. 8

Tabla 1

	N/P 2	N/P 3	N/P 4	N/P 5	N/P 6	N/P 8
PEI	1258±787 (0,34±0,04)	69±11 (0,15±0,03)	61±10 (0,17±0,01)	60±11 (0,19±0,02)	53±8 (0,16±0,05)	51±3 (0,14±0,01)
<i>F</i> <sub>ILO=2</sub>	1197±1729 (0,37±0,23)	604±804 (0,25±0,13)	97±20 (0,17±0,07)	77±19 (0,15±0,03)	73±17 (0,15±0,08)	70±17 (0,16±0,05)
<i>F</i> <sub>ILO=5</sub>	149±16 (0,17±0,04)	169±35 (0,10±0,02)	82±4 (0,11±0,03)	75±15 (0,13±0,02)	74±11 (0,13±0,01)	76±16 (0,14±0,04)
<i>F</i> <sub>ILO=8</sub>	207±137 (0,19±0,10)	366±31 (0,25±0,06)	261±13 (0,12±0,03)	165±43 (0,08±0,04)	106±7 (0,08±0,01)	87±12 (0,12±0,03)
<i>F</i> <sub>ILO=16</sub>	141±26 (0,18±0,02)	292±73 (0,22±0,05)	2314±946 (0,26±0,14)	418±156 (0,17±0,13)	258±61 (0,12±0,03)	213±48 (0,08±0,02)