



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 285 087**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/16 (2006.01)

C12N 15/89 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **03700947 .9**

(86) Fecha de presentación : **23.01.2003**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1467711**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **20.10.2004**

(54) Título: **Formas farmacéuticas de ADN.**

(30) Prioridad: **25.01.2002 GB 0201735**
25.01.2002 GB 0201736

(73) Titular/es: **GLAXO GROUP LIMITED**
Glaxo Wellcome House, Berkeley Avenue
Greenford, Middlesex UB6 0NN, GB

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.11.2007

(72) Inventor/es: **Catchpole, Ian, Richard**

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.11.2007

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

ES 2 285 087 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

Formas farmacéuticas de ADN.

5 La presente invención se refiere a formulaciones farmacéuticas de ADN, y preferiblemente aquellas formulaciones que son adecuadas para la liberación balística en la piel del cuerpo humano. La presente invención proporciona una forma farmacéutica nueva de un agente farmacéutico de ADN, que tiene un elemento central denso que está revestido con un medio de depósito sólido amorfo que contiene el agente farmacéutico de ADN en solución sólida o suspensión dentro de ésta. El elemento central denso es preferiblemente una perla de metal pequeña adecuada para la liberación balística del agente en una célula, comúnmente tales perlas son microperlas más o menos esféricas de tungsteno o de oro de un tamaño de partícula medio que varía entre 0,5 y 10 micrómetros de diámetro. Preferiblemente, el medio de depósito farmacéutico sólido que reviste las perlas es un poliol, preferiblemente estando un poliol en un estado amorfo. Preferiblemente el poliol es un hidrato de carbono tal como trehalosa o sacarosa. El medio de depósito farmacéutico sólido además puede comprender un agente estabilizante que inhibe los efectos degenerativos de los radicales libres, tal como un secuestrador de radicales libres o un quelante de iones metálicos. Las formulaciones farmacéuticas de ADN de la presente invención son estables en almacenamiento, en las que el ADN se estabiliza en su forma superenrollada, y sólo liberan sustancialmente el ADN después de la administración a la piel. Además, se proporcionan los dispositivos de suministro de vacunas para la administración de las vacunas de ADN en la piel, procedimientos de su fabricación, y su uso en medicina.

20 La piel representa una barrera importante para los agentes externos. En el Diccionario Ilustrado de Medicina de Dorland, Edición 28, se proporciona un resumen de la piel humana. Empezando por las capas externas, trabajando hacia dentro, la piel comprende el epitelio que está constituido por el estrato córneo y el epitelio viable, y debajo del epitelio se encuentra la dermis. El epitelio viable está constituido por cuatro capas: Estrato córneo, Estrato lúcido, 25 Estrato granuloso, Estrato espinoso y Estrato basal. El *epitelio* (incluyendo las cinco capas) es la capa no vascular más alejada de la piel, y varía entre 0,07 mm y 0,12 mm de espesor (70-120 μm). El epitelio está poblado con queratinocitos, una célula que produce queratina y constituye el 95% de las células epidérmicas dedicadas. El otro 5% de células son melanocitos. La dermis subyacente normalmente se encuentra en un intervalo de 0,3 mm hasta aproximadamente 3 mm por debajo de la superficie del estrato córneo, y contiene glándulas sudoríparas, folículos pilosos, terminaciones nerviosas y vasos sanguíneos.

30 El estrato córneo domina la barrera de permeabilidad de la piel y está constituido por una docena de capas epiteliales córneas, queratinizadas. Los intersticios estrechos entre los queratinocitos muertos o que mueren en esta región se rellenan con lípidos multilaminares cristalinos. Éstos sellan de forma eficiente los intersticios entre el interior del cuerpo o de la piel y los alrededores proporcionando una barrera hidrófoba para detectar la entrada de moléculas hidrofílicas. Estando el estrato córneo en el intervalo entre 30-70 μm de espesor.

35 Las células de Langerhans se encuentran por toda la capa granular basal del epitelio viable (estrato espinoso y estrato granuloso, (Small Animal Dermatology - Tercera Edición, Muller - Kira - Scott, Ed.: Saunders (1983)) y se considera que desempeñan una función importante en la defensa inicial del sistema inmunológico contra organismos invasores. Por lo tanto, esta capa de la piel representa una zona diana adecuada para algunos tipos de vacuna.

40 Los modos convencionales para la administración de agentes farmacéuticos en o a través de la piel, más comúnmente por medio de una jeringa y aguja hipodérmica, están relacionados con numerosas desventajas. Tales desventajas incluyen dolor, la necesidad de profesionales entrenados para administrar el agente, y también el riesgo de lesiones por pinchazos al administrador con el riesgo adjunto de infección con una enfermedad de origen sanguíneo. Como tal, existe una necesidad de mejorar el procedimiento de administración de todos los tipos de productos farmacéuticos en o a través de la piel.

50 Se han descrito una serie de enfoques alternativos con el fin de superar los problemas de administración del agente a través del estrato córneo, incluyendo diversos dispositivos de liberación balística de vacunas en flujo de gas supersónico.

55 Por lo general, las vacunas de ADN están constituidas por un vector plásmido bacteriano en el que se introduce un promotor vírico potente, el gen de interés que codifica un péptido antigénico y secuencias de una terminación transcripcional/poliadenilación. El gen de interés puede codificar una proteína completa o simplemente una secuencia de péptido antigénico relacionada con el patógeno, tumor u otro agente contra el que se pretende proteger. El plásmido puede cultivarse en bacterias, tales como por ejemplo *E. coli* y después aislarse y prepararse en un medio apropiado, dependiendo de la vía de administración pensada, antes de administrarse al huésped. Después de la administración, 60 las células hospedadoras producen la proteína o péptido codificado del plásmido. Los vectores del plásmido están hechos por lo general sin un origen de replicación que es funcional en células eucariotas, con el fin de evitar la replicación del plásmido en el huésped mamífero y la integración dentro del ADN cromosómico del animal en cuestión. La información en relación con la vacuna de ADN se proporciona en Donnelly y col. "DNA vaccines" Ann. Rev Immunol. 1997 15: 617:648, cuya descripción se incluye en la presente memoria descriptiva en su totalidad como referencias.

65 La liberación de genes basada en plásmidos, en particular a efectos de terapia génica o inmunización, es conocida. Por ejemplo, la administración de ADN desnudo por medio de la inyección en el músculo de ratón se describe en

el documento WO90/11092. Johnston y col, documento WO 91/07487, describen procedimientos para transferir un gen a células vertebradas, por medio del uso de microperlas sobre las que se ha precipitado un polinucleótido que codifica un gen de interés, y acelerando las ADN/microperlas de tal forma que penetran la célula diana. En los documentos US 5.630.796; WO 96/04947, WO 96/12513; WO 96/20022; WO 97/34652; WO 97/48485; WO 99/01168; 5 WO 99/01169 se describen dispositivos para la administración de perlas de tungsteno o de oro revestidas con ADN en células de la piel. Los procedimientos de vacuna usando formas cristalinas del agente farmacéutico liberado balísticamente se describen en el documento WO 99/27961. La presente invención proporciona formas de dosificación de ADN mejoradas para usar dispositivos de liberación balística sin agujas, tales como los que se describen en las publicaciones anteriores. Las formulaciones en las que el ADN se precipita sobre perlas de oro, como se describe en las 10 técnicas, tienen el problema de que es difícil co-formular el ADN con agentes/excipientes adicionales. La presente invención proporciona un procedimiento de co-formulación de agentes adicionales.

En el documento WO 96/03978 se describen las formas farmacéuticas sólidas que comprenden un agente farmacéutico (incluyendo los plásmidos de ADN) y un poliol estabilizante (tal como un azúcar) en donde las formas farmacéuticas están en forma de polvos liberados balísticamente. La estabilización de agentes en vidrios de azúcar amorfos se ha descrito en el documento US 5.098.893. 15

Los azúcares usados en las formulaciones farmacéuticas pueden ser cristalinos o amorfos. Los sólidos amorfos se distinguen de los cristalinos por su falta de orden de largo alcance tridimensional encontrado en los materiales cristalinos. Los sólidos amorfos son similares a los líquidos en un nivel molecular en el que las moléculas se disponen aleatoriamente. Los azúcares amorfos imparten estabilidad a las formulaciones farmacéuticas cuando se almacenan a temperaturas inferiores a la temperatura de transición al estado vítreo. Los azúcares amorfos presentan una propiedad en la que existe un cambio en la movilidad de las moléculas en la matriz del azúcar por debajo de una temperatura denominada la temperatura de transición al estado vítreo. Por debajo de esta temperatura (Tg), los azúcares amorfos existen en un estado vítreo y por encima de esta temperatura en un estado elástico. A temperaturas inferiores a Tg, la movilidad de las moléculas del azúcar y cualquier molécula asociada o atrapada en la matriz del azúcar es extremadamente baja, ocasionando la estabilidad a largo plazo de tales formulaciones. En otras palabras, la formación de un vidrio reduce espectacularmente la velocidad de difusión de las moléculas. Esto también se acompaña de una disminución en la capacidad térmica a presión constante (Cp) en 40% a 100%. Esta transición se puede observar fácilmente 20 por medio de técnicas térmicas sensibles como la calorimetría diferencial de barrido (Duddu, S. P., Zhang G, y Dal Monte, P. R., 1997., Pharm Res., 14: 596-600). Las propiedades estabilizadoras del azúcar también se han atribuido a 25 sus propiedades de unión al hidrógeno con moléculas biológicas como las proteínas.

Es conveniente para los agentes farmacéuticos del ADN que se liberen en forma superenrollada. Se sabe que 30 el ADN superenrollado en preparaciones farmacéuticas líquidas se degrada con el tiempo, dando como resultado la pérdida de la estructura superenrollada y la formación relacionada de estructuras de ADN lineales o en círculo abierto (Evans y col., 2000, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89(1), 76-87; documento WO 97/40839). Un mecanismo por el que puede ocurrir esta reacción de escisión de la cadena es la oxidación del ADN por medio de radicales hidroxilos libres producidos a partir de oxígeno disuelto en las soluciones de ADN, un procedimiento que se cataliza por medio 40 de iones metálicos. La reacción de la formación de radicales libres se puede catalizar por medio de diversos iones metálicos de transición, los más comunes de los cuales son, sin embargo, los iones de hierro y cobre (Fe^{+3} , Fe^{+2} , Cu^{+2} ó Cu^{+1} ; Evans y col. arriba).

La inestabilidad del ADN superenrollado es evidente cuando el ADN está en solución líquida. Sin embargo, la 45 eliminación de iones metálicos traza de soluciones líquidas que contienen ADN superenrollado con quelantes de iones metálicos, y/o la limpieza de radicales libres en solución por medio de los secuestradores no reductores de radicales libres, estabiliza el ADN en forma superenrollada y protege el ADN de la oxidación (documento WO 97/40839). El problema de la estabilización de formas secas de ADN una vez revestidas sobre una perla de oro o de tungsteno no se ha tratado en la técnica hasta ahora. De manera sorprendente, los inventores presentes han observado que las formas 50 secas del ADN, sin la tecnología de la presente invención, cuando se revisten sobre perlas de oro o de tungsteno, también son inestables.

La presente invención supera estos problemas y proporciona una dosis de suministro de ADN que es capaz de administrar y liberar los agentes de ADN de manera eficiente en la piel, con o sin excipientes adicionales, y también 55 en la que el ADN se estabiliza en su forma superenrollada.

Descripción de las figuras

Fig 1, pVAC1.ova

60 La Fig 2 muestra un gráfico del porcentaje de plásmido superenrollado, (%ccc), tanto monomérico, (%cccmon), como dimérico, (%cccdim), formas de plásmido; después del revestimiento y liofilización sobre agujas de punción y almacenamiento a 37°C. Las formulaciones de plásmido usadas contienen cantidades de azúcar variables: Fig 2A: Sacarosa al 5%, Fig 2B: Sacarosa al 10%, Fig 2C: Sacarosa al 17,5, Fig 2D: Sacarosa al 40%, Fig 2E: Trehalosa al 65 40%, Fig 2F: Glucosa al 40%.

La Fig 3 muestra información de calorimetría diferencial de barrido (DSC) para ADN de plásmido, (10 mg/ml), formulaciones en sacarosa al 40%. Fig 3A y B: las formulaciones también contienen TrisHCl 100 mM pH 8.0, EDTA

ES 2 285 087 T3

1 mM, metionina 10 mM y etanol al 2,9%; Las Fig 3A y C representan un ciclo de liofilización de 24 horas; Las Fig 3B y D representan un ciclo de liofilización de 1 hora.

La Fig 4 muestra la información de la microscopía de luz polarizada, para ADN de plásmido, (10 mg/ml), formulaciones en sacarosa al 40%. Fig 4A: las formulaciones también contienen TrisHCl 100 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, metionina 10 mM y etanol al 2,9%; La Fig 4C sólo contiene sacarosa al 40% y la Fig 4D muestra cristales de los excipientes descritos en la formulación que se muestra en la Fig 4A. 1AM, 2AM y 3AM representan un ciclo de liofilización de 24 horas, mientras que 1ST, 2ST y 3ST representan un ciclo de liofilización de 1 hora.

La Fig 5 muestra la información de la microscopía de luz polarizada, para ADN de plásmido liofilizado, (10 mg/ml), formulaciones en azúcares y polioles, que también contienen: TrisHCl 100 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, metionina 10 mM y etanol al 2,9%. Fig 5A, muestra 1: ficoll al 40% p/v, muestra 2: dextrano al 20% p/v, muestra 3: sacarosa al 40% p/v, muestra 4: maltotriosa al 20% p/v. Fig 5B, muestra 5: lactosa al 20% p/v, muestra 6: maltosa al 30% p/v, muestra 7: glucosa al 40% p/v, muestra 8: trehalosa al 40% p/v.

La Fig 6 muestra la estabilidad del plásmido de ADN superenrollado revestido sobre perlas de oro y almacenado durante 1 semana a 25°C.

La Fig 7 muestra la estabilidad del plásmido de ADN superenrollado revestido sobre perlas de oro y almacenado durante 3 semanas a 25°C.

La presente invención proporciona una forma farmacéutica nueva de agentes farmacéuticos de ADN, que tiene un elemento central denso que está revestido con un medio de depósito sólido que contiene el agente farmacéutico de ADN.

Las formas farmacéuticas de vacunas de ADN son un aspecto preferido de la presente invención. En tales aplicaciones el agente que se va a liberar es un polinucleótido que codifica un antígeno o antígenos que derivan de un patógeno tal como microorganismos o virus, o puede ser un antígeno propio en caso de vacuna contra el cáncer u otro antígeno propio.

El componente de ADN de la presente invención puede ser ADN de plásmido lineal, en círculo abierto o superenrollado, pero en una forma relacionada de la presente invención, el ADN puede estar en forma de un vector viral o bacteriano vivo atenuado.

Ciertas realizaciones del dispositivo descrito en la presente memoria descriptiva también tiene la ventaja importante de almacenarse a temperatura ambiente, reduciendo así los costes de logística y liberando espacio frigorífico valioso para otros productos.

El medio de depósito amorfó sólido es preferiblemente un poliol que cumple la función requerida para la presente invención. El depósito debe ser capaz de adherirse a la microperla en un grado suficiente que el depósito permanezca físicamente estable y unido durante el almacenamiento prolongado, y también permanezca sustancialmente intacto durante el procedimiento de administración cuando la microperla revestida se proyecta a través del estrato córneo. El depósito también debe ser capaz de mantener o contener una suspensión o solución del agente que se va a suministrar en cualquier forma seca o parcialmente seca, que se libera en la piel durante la biodegradación del medio de depósito.

La biodegradación del medio en el sentido de la presente invención se refiere a que el medio de depósito cambia de estado, de tal forma que cambia de su estado de no liberación al de su liberación, por el cual el agente entra en la piel. La liberación del agente activo puede implicar uno o más procesos físicos y/o químicos tales como hidratación, difusión, transición de fase, cristalización, disolución, reacción enzimática y/o reacción química. Dependiendo de la elección del medio de depósito, la biodegradación puede inducirse por uno o más de los siguientes: agua, fluidos corporales, humedad, temperatura corporal, enzimas, catalizadores y/o reactivos. Por lo tanto, el cambio del medio de depósito puede inducirse por hidratación, y calentamiento relacionado con la elevada humedad y temperatura de la piel. Después, el medio de depósito se puede degradar por disolución y/o hinchañón y/o cambio de fase (cristalina o amorfa), desintegrandose así o aumentando simplemente la permeación del medio.

Preferiblemente el medio se disuelve, y se metaboliza o expulsa o excreta del cuerpo, pero el depósito puede permanecer alternativamente unido a la microperla que se puede expulsar del cuerpo a través de diversos mecanismos, incluyendo el desprendimiento de células muertas de la piel durante el cambio normal de la piel. Se prefiere la liberación del agente por disolución del medio de depósito.

Preferiblemente el medio de depósito sólido es un poliol (tal como los descritos en el documento WO 96/03978). Los medios de depósito de poliol adecuados incluyen hidratos de carbono (tales como azúcares), polisacáridos, polioles sustituidos tales como hidratos de carbono derivatizados de forma hidrófoba, aminoácidos, polímeros o copolímeros biodegradables tales como poli(ácido hidroxi)s, polianhídridos, poli(ortho)ésteres, poliuretanos, poli(ácido butírico)s, poli(ácido valérico)s, y poli(lactida-co-caprolactona)s, y polilactida co-glicolida.

El depósito sólido puede estar en un estado amorfo o cristalino y también puede ser parcialmente amorfo o parcialmente cristalino. Más preferiblemente, sin embargo, todo o sustancialmente todo el depósito está en un estado amorfo.

ES 2 285 087 T3

Más preferiblemente todavía es que el depósito amorfo está en forma de un vidrio (documento US 5.098.893). Más preferiblemente el depósito es un vidrio de azúcar. Un depósito vítreo puede tener cualquier temperatura de transición al estado vítreo, pero preferiblemente tiene una temperatura de transición al estado vítreo que estabiliza el agente farmacéutico durante el almacenamiento y también facilita la liberación rápida del agente después de la introducción 5 del depósito en la piel. Por consiguiente, la temperatura de transición al estado vítreo es superior a 30°C-40°C, pero más preferiblemente es aproximadamente la temperatura corporal (tal como, pero no limitada a 40°C-50°C).

Los medios de depósito particularmente preferidos son aquellos que estabilizan el agente que se va a suministrar durante el periodo de almacenamiento. Por ejemplo, el antígeno o agente disuelto o disperso en un cristal de poliol 10 o simplemente secado en un poliol están estables en almacenamiento durante periodos prolongados de tiempo (documento US 5.098.893, US 6.071.428; WO 98/16205; WO 96/05809; WO 96/03978; US 4.891.319; US 5.621.094; WO 96/33744). Tales polioles forman el conjunto preferido de medios de depósito.

Los polioles preferidos incluyen azúcares, que incluyen mono, di, tri, u oligosacáridos y sus alcoholes de azúcar 15 correspondientes. Los azúcares adecuados para usar en la presente invención se conocen bien en la técnica e incluyen trehalosa, sacarosa, lactosa, fructosa, galactosa, glucosa, mannosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa, maltosa, o dextrosa y alcoholes de azúcar de los anteriormente mencionados, tales como mannitol, lactitol y maltitol. Se prefieren Sacarosa, Glucosa, Lactosa, Rafinosa y Trehalosa.

20 Los medios de depósito de la presente invención pueden además contener preferiblemente un agente estabilizante que inhibe los efectos degenerativos de los radicales libres. Los agentes estabilizantes preferidos incluyen agentes quelantes de iones metálicos estabilizantes, tales agentes quelantes de iones metálicos preferidos incluyen hexafosfato de inositol, tripolifosfato, ácido succínico y málico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), trometamina (TRIS), Desferal, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y ácido etilendiaminodiortohidrofenilacético (EDDHA). Otros 25 agentes estabilizantes preferidos son los depuradores no reductores de radicales libres, y preferiblemente tales agentes son etanol, metionina o glutatióna. Otros quelantes y depuradores adecuados (y aquellos que no son adecuados) se pueden identificar fácilmente por parte del experto en la técnica por experimentación rutinaria (como se describe en el documento WO 97/40839).

30 Los medios de depósito sólidos preferidos en los dispositivos de la presente invención contienen un agente quelante de iones metálicos o un depurador no reductor de radicales libres. Más preferiblemente, los medios de depósito sólidos preferidos en los dispositivos de la presente invención contienen tanto un agente quelante de iones metálicos como un depurador no reductor de radicales libres.

35 Las cantidades de los agentes estabilizantes se pueden determinar por parte del experto en la técnica, pero generalmente varían entre 0,1 mM-10 mM para los quelantes de iones metálicos, el etanol está presente en una cantidad hasta aproximadamente el 5% (v/v), la metionina está presente en aproximadamente 0,1 mM a 100 mM y el glutatión está presente en aproximadamente el 0,1% al 10% (v/v).

40 Las combinaciones preferidas de agentes estabilizantes son (a) solución de etanol tamponada con fosfato en combinación con metionina o EDTA, (b) EDTA tamponada con Tris en combinación con metionina o etanol (o combinaciones de metionina y etanol).

45 En particular, las formulaciones preferidas que se pueden combinar con ADN y revestir sobre los elementos centrales densos para formar formas de dosificación sólidas de la presente invención, contienen polioles (preferiblemente sacarosa o trehalosa) disueltos en agua desmetalizada o tampones basados en Fosfato o Tris y además comprenden:

- A. Metionina 10 mM y etanol al 2,9%, o
- 50 B. Etanol al 3,7% y EDTA 1 mM, o
- C. Tris 100 mM, EDTA 1 mM y metionina 10 mM y etanol 2,9%, o
- D. Tris 100 mM, EDTA 1 mM y metionina 10 mM, o
- 55 E. Tris 100 mM, EDTA 1 mM y etanol al 2,9%.

En los procedimientos preferidos de fabricación de la presente invención el ADN se almacena y manipula en estos agentes estabilizantes antes de la formulación final con el azúcar.

60 Además de estos agentes estabilizantes, se pueden tomar otras medidas para potenciar la estabilidad del ADN en las vacunas sólidas. Por ejemplo, las formulaciones se pueden realizar usando soluciones que se desmetalizaron ellas mismas antes de usar (por ejemplo, usando resina desmetalizadora disponible en el mercado, tal como Chelex 100 de Biorad) y/o la formulación se puede finalizar en un pH elevado (tal como pH 8-10).

65 Preferiblemente, el ADN está en forma de un plásmido superenrollado. Una ventaja principal de la presente invención para estas formulaciones es el hecho de que el ADN está estabilizado de tal forma que tras la liberación, permanece en gran parte en su forma superenrollada, y preferiblemente en su forma superenrollada monomérica.

La estabilidad del ADN de plásmido se puede definir de una serie de formas y puede ser un fenómeno relativo determinado por las condiciones de almacenamiento tales como pH, humedad y temperatura. Para el almacenamiento en presencia de iones de hierro sobre el depósito revestido, preferiblemente >50% del plásmido permanece superenrollado, (ccc, circular cerrado covalentemente), después del almacenamiento durante 3 meses a 4°C. Más preferiblemente,

- 5 en las condiciones de almacenamiento descritas, >60% del plásmido permanece ccc y más preferiblemente, en estas condiciones de almacenamiento, >90% del plásmido permanece ccc durante 3 meses a 4°C. Para el revestimiento sobre agujas o microagujas basadas en iones no metálicos, la estabilidad del ADN de plásmido sería preferiblemente >60% y más preferiblemente 80% y más preferiblemente >90% ccc después de 3 meses de almacenamiento a 4°C. Más preferiblemente, en estas condiciones de almacenamiento, >90% del plásmido permanece ccc durante 1 año a 4°C, y
- 10 más preferiblemente >90% del plásmido permanece ccc durante 2 años a 4°C. Más preferiblemente, la estabilidad del ADN anterior se consigue en estas condiciones durante los mismos periodos de tiempo a 25°C.

El ADN dentro de un medio de depósito sólido (para facilidad de medida, cuando se reviste sobre agujas de punción) se estabiliza preferiblemente en su forma superenrollada (ccc) durante los estudios de estabilidad acelerada, y más preferiblemente el ADN se estabiliza en su forma ccc monomérica. Un ejemplo de un estudio de estabilidad acelerada es cuando las agujas revestidas secas se mantienen a 37°C durante 4 semanas seguido de un análisis de la estructura del ADN en el transcurso del tiempo. En este tipo de estudio, preferiblemente más del 50% del ADN permanece en su forma ccc, más preferiblemente más del 60% permanece en su forma ccc, más preferiblemente más del 70% permanece en su forma ccc, más preferiblemente más del 80% permanece en su forma ccc y más preferiblemente más del 90% permanece en su forma ccc. En estas condiciones, y niveles preferidos de ccc, también se prefiere que la relación de ADN ccc monomérica : dimérica sea aproximadamente 1 (tal como en el intervalo de 0,8-1,2, o más preferiblemente en el intervalo de 0,9-1,1 y más preferiblemente en el intervalo de 0,95-1,5), o superior a 1.

- 25 Los estudios para determinar la estabilidad del plásmido son bien conocidos para los expertos en la técnica y se describen en (Evans y col. arriba; documento WO 97/40839). Estos incluyen técnicas para medir y cuantificar el porcentaje de ADN de plásmido, ccc, superenrollado o bien por electroforesis en gel de agarosa, HPLC de intercambio de aniones, (Ferreira, G. y col., 1999, *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 5, págs. 57-59) o electroforesis capilar en gel, (Schmidt y col., 1999, *Anal. Biochem.*, 274, 235-240). La relación de ccc monomérica : dimérica se puede medir por análisis de intensidad de la imagen después de la electroforesis en gel de agarosa (en ausencia de cualquier agente de intercalación) y teñido con EtBr, usando el software disponible en el mercado tal como Labworks 4.0 que funciona en un sistema Bioimaging de UVP.

En el contexto de la presente invención el medio de depósito sólido reviste los elementos centrales de una forma que la formulación resultante es adecuada para la administración por medio de dispositivos de liberación balística. Por consiguiente, cada elemento central puede estar cubierto totalmente o parcialmente por el depósito, o una pluralidad de elementos pueden estar atrapados en una matriz del depósito sólido. En un procedimiento relacionado para producir las formas de dosificación de la presente invención, una gran cantidad de depósito que abarca una gran serie de elementos centrales puede triturarse en partículas más pequeñas que son adecuadas para la administración a través de dispositivos de liberación balística.

Otros excipientes adecuados que se pueden incluir en la formulación incluyen tampones, aminoácidos, inhibidores de cambio de fase (“envenenadores de cristal”) que se pueden añadir para evitar el cambio de fase del revestimiento durante el procesamiento o almacenamiento, o inhibidores para evitar reacciones químicas nocivas durante el procesamiento o almacenamiento tales como los inhibidores de la reacción de Maillard como aminoácidos.

Las formas de dosificación sólidas de la presente invención se usan en la transfección balística de células de la piel usando dispositivos que arrastran las partículas revestidas de ADN en un flujo de gas. Las partículas pasan a través del estrato córneo y entran en una célula en la que se libera el ADN y se expresa por medio de la célula hospedadora. De forma alternativa, la partícula entra en el espacio extracelular y libera el ADN en éste. Por consiguiente, los elementos centrales que son adecuados para usar en la presente invención son aquellos que son adecuados para este propósito. Los elementos centrales imparten, tras la forma farmacéutica final, fuerza e impulso suficientes para penetrar en el estrato córneo en cualquier dispositivo de liberación balística proporcionado. Se prefiere que los elementos centrales tengan densidad suficiente para impartir el impulso suficiente a las partículas revestidas de ADN, los elementos centrales densos adecuados han resultado ser micropellets de oro o de tungsteno. El tamaño de los elementos centrales es preferiblemente el que imparte masa suficiente para proporcionar el impulso necesario a las partículas revestidas de ADN, mientras que no sea demasiado grande de tal forma que las células de la piel sufran demasiado daño. Los tamaños de partículas de los elementos centrales adecuados son aquellos que cuando se revisten forman partículas de un tamaño medio que varía entre 0,5 µm y 100 µm, preferiblemente entre 1 µm y 50 µm, más preferiblemente entre 1 µm y 10 µm, y más preferiblemente entre aproximadamente 2 µm de diámetro.

En general, los elementos centrales son más o menos esféricos, aunque se pueden usar formas no regulares. Más preferiblemente los elementos centrales son micropellets de oro o de tungsteno.

65 La presente invención reivindica que un azúcar amorfo cuando está presente con partículas metálicas y ADN impartirá estabilidad a largo plazo a la formulación. Otros excipientes como tensioactivos y tampones se pueden incluir en la formulación.

ES 2 285 087 T3

Los ejemplos de procedimientos para la preparación de tales formulaciones que contienen azúcar amorf incluyen:

1. Secado por congelación

- 5 Mezclar la solución que contiene azúcar, ADN, partículas de oro y llenar en viales de vidrio. Estos viales se taponan y se cargan parcialmente en un liofilizador. Después, la temperatura del estante se reduce a -45°C, llevando al producto en los viales que se están congelando. Después de dejar que todos los viales se congelen, el condensador se refrigerá hasta una temperatura por debajo de -60°C. Después se realiza el secado primario elevando la temperatura del estante hasta aproximadamente -30°C mientras que se aplica un vacío de aproximadamente 100 mT. Durante el secado primario se sublima el agua de los cristales de hielo que se forma. Después de que se complete el secado primario, la temperatura del estante se eleva hasta por encima de la temperatura ambiente y se aplica el vacío máximo. El secado secundario elimina cualquier agua estrechamente unida y seca el polvo para conseguir la estabilidad a largo plazo.
- 10

2. Secado por pulverización

- 15 El secado por pulverización es un procedimiento de deshidratación que utiliza el calor de una corriente de gas caliente (normalmente aire) para evaporar las gotas dispersas creadas por atomización de una alimentación de líquido continua. Los productos en polvo resultantes se secan en unos segundos en partículas finas. La viabilidad del secado por pulverización para generar polvos de proteína terapéutica se ha demostrado ampliamente ((Broadhead, J., Rouan, S.K.E., Hau, I y Rhodes, C.T. 1994. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 458-467.; Mumenthaler, M., Hsu, C.C., y Pearlman, R. 1994. *Pharm. Res.* 11: 12-20)). En una aplicación como tal para nuestras mezclas de formulación, la solución formulada con ADN, partículas de oro y azúcar se introducirá en un secador por pulverización con una temperatura de entrada típica que varía entre 50°C y 150°C, típicamente a una velocidad de flujo entre 0,1 y 10 ml/min. El polvo resultante está seco y se recoge de la cámara de recogida.
- 20

3. Secado por congelación de pulverización

- 25 El secado por congelación de pulverización es un procedimiento en el que la solución que contiene ADN, partículas de oro y azúcares se pulveriza sobre bandejas que contienen hielo seco o nitrógeno líquido. Esto resulta en la congelación inmediata de las gotas. Las bandejas se cargan después en un liofilizador y las partículas se secan después por congelación de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.
- 30

Usando estas técnicas cada dosis de liberación de ADN sólido puede cargarse con cantidades relativamente elevadas de ADN. Las formulaciones resultantes de las técnicas anteriores se pueden usar directamente o después de triturar o tamizar las perlas centrales densas revestidas en el medio de depósito.

35

Preferiblemente, las formulaciones de vacunas de la presente invención contienen ADN que codifica un antígeno o composición antigénica capaz de provocar una respuesta inmune contra un patógeno humano, cuyo antígeno o composición antigénica se deriva del VIH-1, (tal como tat, nef, gp120 ó gp160), herpesvirus humanos, tales como gD 40 o derivados de los mismos o proteína Temprana Inmediata tal como ICP27 de HSV1 ó HSV2, citomegalovirus (esp. Humano) (tal como gB o derivados de los mismos) Rotavirus (incluyendo virus vivos atenuados), virus de Epstein Barr (tal como gp350 o derivados de los mismos), Virus Varicela Zoster (tal como gpl, II y IE63), o de un virus de la hepatitis tal como el virus de la hepatitis B (por ejemplo, antígeno de la Superficie de la Hepatitis B o un derivado del mismo), virus de la Hepatitis A, virus de la Hepatitis C y virus de la Hepatitis E, o de otros patógenos víricos, tales como paramixovirus: virus Sincitrial Respiratorio (tal como las proteínas F y G o derivados de las mismas), virus de la parainfluenza, virus del sarampión, virus de las paperas, virus del papiloma humano (por ejemplo, HPV6, 11, 16, 18,...), flavivirus (por ejemplo, Virus de la Fiebre Amarilla, Virus del Dengue, virus de la encefalitis vector-garrapata, virus de la encefalitis japonesa) o virus de la influenza (virus vivo entero o inactivado, virus de la influenza fraccionado, cultivado en huevos o células MDCK, o células Vero o virusomas de la gripe enteros (como describe R. Gluck; Vaccine, 1992, 10, 915-920) o proteínas purificadas o recombinantes de los mismos, tales como proteínas HA, NP, NA, o M, o combinaciones de los mismos), o derivados de patógenos bacterianos tales como *Neisseria spp*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (por ejemplo polisacáridos capsulares y conjugados de los mismos, proteínas de unión a la transferrina, proteínas de unión a la lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo proteínas M o fragmentos de las mismas, proteasa C5A, ácidos lipoteicoicos), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocida como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo invasinas y adhesinas de alto y bajo peso molecular); *Bordetella spp*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo, toxina de pertussis o pertactina o derivados de la misma, hemaglutinina finamente, adenilato ciclase, fimbrias), *B. parapertussis* y *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium spp.*, incluyendo *M. tuberculosis* (por ejemplo ESAT6, Antígeno 85A, -B o -C), *M. Bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella spp*, incluyendo *L. pneumophila*; *Escherichia spp*, incluyendo *E. coli* enterotóxica (por ejemplo factores de colonización, toxina lábil al calor o derivados de la misma, toxina estable al calor o derivados de la misma), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatogénica (por ejemplo toxina como la toxina shiga o derivados de la misma); *Vibrio spp*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina del cólera o derivados de la misma); *Shigella spp*, incluyendo *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia spp*, incluyendo *Y. enterocolitica* (por ejemplo una proteína Yop), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter spp*, incluyendo *C. jejuni* (por ejemplo, toxinas, adhesinas e invasinas) y *C. coli*; *Salmonella spp*, incluyendo *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*; *Listeria spp*, incluyendo *L. monocytogenes*; *Helicobacter spp*, incluyendo *H. pylori* (por ejemplo toxina ureasa, catalasa, vacuolizante); *Pseudomonas spp*, incluyendo *P. aeruginosa*; *Staphylococcus spp*, incluyendo *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus spp*, incluyendo *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium spp*, incluyendo *C. tetani* (por ejemplo toxina

60

65

del tétanos y derivados de la misma), *C. botulinum* (por ejemplo toxina botulínica y derivados de la misma), *C. difficile* (por ejemplo toxinas A o B del clostridium y derivados de las mismas); *Bacillus spp.*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo toxina botulínica y derivados de la misma); *Corynebacterium spp.*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo toxina de la difteria y derivados de la misma); *Borrelia spp.*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB),

5 *B. garinii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (por ejemplo OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp.*, incluyendo *E. equi* y el agente de la Ehrlichiosis Granulocítica Humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a la heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a la heparina), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas de la membrana externa excepcionales), *T. denticola*, *T. hyoysenteriae*; o derivados de parásitos tales como *Plasmodium spp.*, incluyendo *P. falciparum*; *Toxoplasma spp.*, incluyendo *T. gondii* (por ejemplo SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba spp.*, incluyendo *E. histolytica*; *Babesia spp.*, incluyendo *B. microti*; *Tripanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, incluyendo *S. mansoni*, derivados de la levadura tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus*, incluyendo *C. neoformans*. Otras vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo PRP y conjugados de los mismos), *H. influenzae* no tipificable, por ejemplo OMP26, adhesinas de elevado peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbrina y péptidos derivados de fimbrinas (documento US 5.843.464).

20 En otra realización de la presente invención la forma farmacéutica del ADN contiene una vacuna de ADN en combinación con un antígeno sin ADN tal como un antígeno proteína o polisacárido derivado de un patógeno.

Una de las ventajas de la presente invención es la capacidad para co-formular el agente del ADN junto con agentes activos adicionales, una capacidad que ha estado limitada con otros agentes farmacéuticos de ADN sólidos. Por 25 ejemplo, la vacuna de ADN también puede comprender un agente para potenciar la captación del ADN en la célula, un adyuvante u otro inmunoestimulante para mejorar y/o dirigir la respuesta inmune, y también puede comprender excipiente(s) farmacéuticamente aceptable(s).

Por ejemplo, el medio de depósito farmacéutico sólido puede contener preferiblemente un agente de condensación 30 del ADN, por ejemplo espermidina o PEI (polietilenimina). Otros excipientes que se pueden incluir en la formulación incluyen tampones, aminoácidos, inhibidores de cambio de fase (“envenenadores de cristal”) que se pueden añadir para evitar el cambio de fase del revestimiento durante el procesamiento o almacenamiento, o inhibidores para evitar reacciones químicas nocivas durante el procesamiento o almacenamiento tales como los inhibidores de la reacción de Maillard como aminoácidos.

35 Un agente adicional preferido para el co-atrapado dentro del medio de depósito con el ADN es un inhibidor de ADNasa. Un ejemplo de un inhibidor de ADNasa que se prefiere es el ácido aurinticarboxílico (ATA, Glasspool, J. y col., (2000), *Molecular Therapy* 2: 140-146).

40 Las vacunas de la presente invención pueden también incluir de manera ventajosa un adyuvante inmunológicamente efectivo en solución sólida junto con el ADN. De forma alternativa, el adyuvante se puede asociar con microperlas distintas a la microperla revestida con ADN. Los adyuvantes adecuados para las vacunas de la presente invención comprenden aquellos adyuvantes que son capaces de potenciar las respuestas del anticuerpo contra el inmunógeno. Los agentes inmunoestimuladores adecuados incluyen, pero esta lista no es de ningún modo exhaustiva y no excluye otros agentes: imidazoquinolinas sintéticas tales como imiquimod [S-26308, R-837], (Dockrell y Kinghorn, 2001, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48, 751-755; Harrison y col. *Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone or combined with a glycoprotein vaccine*, Vaccine 19: 1820-1826, (2001)); y resiquimod [S-28463, R-848] (Vasilakos y col. *Adjuvant activities of immune response modifier R-848: Comparison with CpG ODN*, Cellular immunology 204: 64-74 (2000).), bases de Schiff de carbonilos y aminas que se expresan de forma constitutiva sobre 45 las superficies de la célula T y célula que presenta el antígeno, tales como tucaresol (Rhodes, J. y col. *Therapeutic potentiation of the immune system by co-stimulatory Schiff-base-forming drugs*, Nature 377: 71-75 (1995)), citocina, quimiocina y moléculas co-estimuladoras en forma de proteína o péptido, esto incluiría citoquinas pro-inflamatorias tales como GM-CSF, IL-1 alfa, IL-1 beta, TGF-alfa y TGF-beta, inductores de Th1 tales como interferón gamma, IL-2, IL-12, IL-15 e IL-18, inductores de Th2 tales como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 y otras quemoquinas y genes co-estimuladores tales como MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 y CD40L, otros ligandos inmunoestimuladores de fijación como diana tales como CTLA-4 y L-selectina, proteínas y péptidos que estimulan la apoptosis tales como Fas, (49), adyuvantes basados en lípidos sintéticos, tales como vaxfectina, (Reyes y col, *Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid DNA immunization*, Vaccine 19: 3778-3786) escualeno, alfa-tocoferol, polisorbato 80, DOCP y colesterol, endotoxina, [LPS], Beutler, B., 50 *Endotoxin, Toll-like receptor 4, and the afferent limbo of innate immunity*, Current Opinion in Microbiology 3: 23-30 (2000); oligo- y di-nucleótidos CpG, Sato, Y. y col., *Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization*, Science 273 (5273): 352-354 (1996). Hemmi, H. y col., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*, Nature 408: 740-745, (2000) y otros ligandos potenciales que accionan los receptores Toll-like para producir citoquinas que inducen Th1, tales como lipoproteínas Micobacterianas sintéticas, proteína Micobacteriana 55 p19, peptidoglicano, ácido teicoico y lípido A.

Algunos adyuvantes preferidos para provocar una respuesta tipo Th1 de forma predominante incluyen, por ejemplo, un derivado del Lípido A tal como el Lípido A monofosforilado, o preferiblemente Lípido A monofosforilado 3-de-

ES 2 285 087 T3

- O-acilado. Los adyuvantes MPL[®] están disponibles en Corixa Corporation (Seattle, WA; véase, por ejemplo, Patente de EE. UU. Nº 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en los que el dinucleótido CpG es no metilado) también inducen una respuesta Th1 de forma predominante. Tales oligonucleótidos se conocen bien y se describen, por ejemplo, en el documento WO 96/02555, WO 99/33488 y Patente de EE. UU. Nº 6.008.200 y 5.856.462. Las secuencias de ADN inmunoestimuladoras también se describen, por ejemplo en Sato y col. *Science* 273:352, 1996. Otro adyuvante preferido comprende una saponina, tal como Quil A, o derivados de la misma, incluyendo QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escin; Digitonin; o saponinas *Gypsophila* o *Chenopodium quinoa*.
- En este aspecto de la presente invención el adyuvante o agente inmunoestimulador preferido es imiquimod u otras moléculas relacionadas (tales como resiquimod) como se describe en la solicitud de patente PCT número WO 94/17043 (cuyos contenidos se incorporan en la presente memoria descriptiva mediante referencia).
- En una realización de la invención, se administra/suministra un polinucleótido en forma de ADN “desnudo”, por ejemplo como se describe en Ulmer y col. *Science* 259: 1745-1749, 1993 y revisa Cohen, *Science* 259: 1691-1692, 1993. La captación de ADN desnudo se puede aumentar revistiendo el ADN sobre pequeñas perlas de microperlas, tales como perlas de oro o biodregadables, que se transportan de forma eficiente en las células; o usando otros agentes bien conocidos que facilitan la transfección, tales como Fosfato Cálcico o DEAE dextrano.
- La cantidad de ADN expresable en cada administración de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos en vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo de la construcción específica de ADN que se emplee, sin embargo, se espera que cada dosis comprenda por lo general 1-1.000 µg de ADN, preferiblemente 1-500 µg, más preferiblemente 1-100 µg, de los cuales el intervalo más preferible es de 1 a 50 µg. Se puede determinar una cantidad óptima para una vacuna particular por medio de estudios convencionales que implican la observación de respuestas inmunes apropiadas en sujetos. Después de una vacuna inicial, los sujetos pueden recibir una o más inmunizaciones de refuerzo espaciadas de forma adecuada.
- La presente invención también proporciona dispositivos de liberación balística cargados con formas de dosificación de ADN de la presente invención.
- Las formulaciones de la presente invención se pueden usar tanto para efectos profilácticos como terapéuticos. Por consiguiente, la presente invención proporciona un procedimiento para tratar un mamífero susceptible a o que padece una enfermedad infecciosa o cáncer, o alergia, o enfermedad autoinmune. En otro aspecto de la presente invención se proporciona una vacuna como se describe en la presente memoria descriptiva para usar en medicina. La preparación de la vacuna se describe generalmente en *New Trends and Developments in Vaccines*, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, EE. UU. 1978.
- La presente invención se ilustra con, pero no se limita a, los ejemplos siguientes.
- Ejemplo 1
- Demostración de revestimiento de microperlas con un medio de depósito que comprende ADN de plásmido*
- Preparación del plásmido y formulaciones*
- Los plásmidos usados en este estudio se muestran todos en la Fig. 1. pEGFP-C1 es un vector de expresión de GFP, (Clontech, Palo Alto, California, EE. UU.). pGL3CMV es un vector de expresión de luciferasa basado en pGL3 Basic, (Promega Corporation., Madison, Wisconsin, EE. UU.), en el que el promotor inmediato temprano del CMV acciona la expresión de la luciferasa.
- pVAC1.ova es un plásmido de expresión de ovalbúmina de pollo, construido por ADNc amplificado por PCR de ligación que codifica la ovalbúmina de pollo de pUGOVA, en el vector de expresión pVAC1. pVAC1 es una modificación del vector de expresión mamífero, pCI, (Promega) en la que el sitio de clonación múltiple, de EcoRI a Bst ZI, se ha reemplazado por la secuencia IRES de EMCV flanqueada en 5' por sitios de restricción de enzimas Nhe I, Rsr II y Xho I únicos y en 3' por Pac I, Asc I y Not I únicos, amplificados de pGL3Basic, (Promega). El ADN de plásmido superenrollado, (endotoxina baja), se purificó a gran escala, aproximadamente 100 mg de rendimiento, hasta una pureza elevada usando una combinación de lisis alcalina en SDS, ultrafiltración y cromatografía en columna de intercambio de aniones.
- Los plásmidos se resuspendieron en TE, (TrisHCl 10 mM, EDTA 1 mM), pH 8,0 en 1 ug/ul y se determinaron como superenrollados al >95% tras el análisis por electroforesis en gel de agarosa.
- Los plásmidos se formularon en una diversidad de soluciones, para agujas de revestimiento, a través de un procedimiento convencional de precipitación en etanol a gran escala. El ADN precipitado se volvió a suspender directamente en las soluciones acuosas de formulación en concentraciones de 0,5 ug/ul a 12 ug/ul, (Véase Capítulo 1, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, J. y col., 2^a Edición, 1989, CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU.).

ES 2 285 087 T3

1.2 Secado por congelación

Mezclar la solución que contiene azúcar (sacarosa o trehalosa entre el 1% y el 40%), plásmido de ADN, partículas de oro y llenar en viales de vidrio. Estos viales se taponan y se cargan parcialmente en un liofilizador. Después, la

- 5 temperatura del estante se reduce a -45°C, llevando al producto en los viales que se están congelando. Después de dejar que todos los viales se congeleen, el condensador se refrigerará hasta una temperatura por debajo de -60°C. Después se realiza el secado primario elevando la temperatura del estante hasta aproximadamente -30°C mientras que se aplica un vacío de aproximadamente 100 mT. Durante el secado primario se sublima el agua de los cristales de hielo que se forma. Después de que se complete el secado primario, la temperatura del estante se eleva hasta por encima de la 10 temperatura ambiente y se aplica el vacío máximo. El secado secundario elimina cualquier agua estrechamente unida y seca el polvo para conseguir la estabilidad a largo plazo.

1.3 Secado por pulverización

15 El secado por pulverización es un procedimiento de deshidratación que utiliza el calor de una corriente de gas caliente (normalmente aire) para evaporar las gotas dispersas creadas por atomización de una alimentación de líquido continua. Los productos en polvo resultantes se secan en unos segundos en partículas finas. La viabilidad del secado por pulverización para generar polvos de proteínas terapéuticas se ha demostrado ampliamente ((Broadhead, J., Rouan, S.K.E., Hau, L y Rhodes, C.T. 1994. *J. Pharm. Pharmacol.* 46: 458-467.; Mumenthaler, M., Hsu, C.C., y Pearlman, R. 1994. *Pharm. Res.* 11: 12-20)). En una aplicación como tal para nuestras mezclas de formulación, la solución formulada con ADN, partículas de oro y azúcar se introducirá en un secador por pulverización con una temperatura de entrada típica que varía entre 50°C y 150°C, típicamente a una velocidad de flujo entre 0,1 y 10 ml/min. El polvo resultante está seco y se recoge de la cámara de recogida.

25 1.4 Secado por congelación de pulverización

El secado por congelación de pulverización es un procedimiento en el que la solución que contiene el ADN, partículas de oro y azúcares se pulveriza sobre bandejas que contienen hielo seco o nitrógeno líquido. Esto resulta en la congelación instantánea de las gotas. Las bandejas se cargan después en un liofilizador y las partículas se secan 30 después por congelación de acuerdo con el procedimiento descrito anteriormente.

Las formulaciones resultantes de las técnicas anteriores se pueden usar directamente o después de triturar en depósitos de liberación balística convencionales, y se puede seguir la expresión en células diana observando la expresión de la luciferasa. Las muestras también son estables como se miden a través del mantenimiento de la estructura 35 superenrollada.

Ejemplo 2

40 Estabilidad de ADN de plásmido, en formulaciones de azúcar diferentes, después del revestimiento, liofilización y almacenamiento en agujas, a 37°C

Se realizó una comparación entre la estabilidad del ADN de plásmido de una serie de formulaciones de ADN diferentes, en la que se variaba o bien la cantidad de azúcar o bien el tipo de azúcar usado en la formulación. Todos los otros excipientes que resultaron óptimos previamente para la estabilidad y liberación de ADN estaban presentes 45 en todas las formulaciones (esto es, TrisHCl 100 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, metionina 10 mM y etanol al 2,9%). Se compararon las formulaciones para detectar su capacidad de estabilizar ADN de plásmido superenrollado, después del revestimiento y liofilización en agujas, tras el almacenamiento durante hasta un mes a 37°C, (estudio de la estabilidad acelerada del ADN). Después el ADN de plásmido (pVAC1.OVA) se eluyó y se recuperó de forma convencional y se sometió a electroforesis en gel de agarosa (100V, 100 mA durante 2 horas), en ausencia de agentes 50 de intercalación (Sambrook, J. y col., arriba). Después, la integridad del ADN de plásmido eluido se controló después de teñir con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV. El porcentaje de formas diméricas y monoméricas del plásmido superenrollado y también cualquier forma lineal y circular abierta de estas muestras se midieron como intensidad de imagen usando el software del análisis de imagen de Labworks 4.0 del Sistema Bioimaging de UVP.

55 Los datos se muestran en la Fig 2, como un gráfico del porcentaje de plásmido superenrollado, (%ccc), tanto monomérico, (%cccmon), como dimérico, (%cccdim), formas de plásmido; después del revestimiento y liofilización sobre agujas de punción y almacenamiento a 37°C. Las formulaciones de plásmido usadas contienen cantidades de azúcar variables: Fig 2A: Sacarosa al 5%, Fig 2B: Sacarosa al 10%, Fig 2C: Sacarosa al 17,5, Fig 2D: Sacarosa al 40%, Fig 2E: Trehalosa al 40%, Fig 2F: Glucosa al 40%.

Los datos sugieren que todas las formulaciones que contienen azúcares mantienen un grado elevado de estabilidad del plásmido, incluso después de almacenar a 37°C durante hasta un mes, más del 80% y hasta el 98% del plásmido permanece en forma superenrollada. Para las formulaciones que contienen niveles de azúcar del 40% (p/v), el balance 60 entre las formas diméricas y monoméricas del plásmido permanece relativamente constante, con la forma monomérica preferida predominando en las formulaciones de azúcar que varían de trehalosa a sacarosa a glucosa, (Fig 2D, 2E y 2F). Para las formulaciones que contienen concentraciones inferiores de sacarosa, la forma dimérica tiende a predominar sobre la monomérica, especialmente tras el almacenamiento prolongado a 37°C, (Fig 2A, 2B y 2C). En general, la

ES 2 285 087 T3

información concuerda con que cuanto más elevado es el nivel de azúcar presente en la formulación, mayor es la estabilidad del ADN de plásmido.

Ejemplo 3

5 *Demostración de la formación de cristal amorfó después de la liofilización de ADN de plásmido, en formulaciones de sacarosa que contienen excipientes*

10 *Análisis de formulaciones de ADN de plásmido, liofilizado, por calorimetría diferencial de barrido, (DSC)*

15 Se prepararon muestras de formulaciones liofilizadas de sacarosa/ADN que contenían ADN de plásmido (pVAC1.OVA), (10 mg/ml), en sacarosa al 40% y también se prepararon adicionalmente muestras liofilizadas que contenían TrisHCl 100 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, metionina 10 mM y etanol al 2,9%. Las muestras se dividieron y se sometieron a ciclos de liofilización de 1 hora o de 24 horas. Las muestras se sometieron después a análisis por calorimetría diferencial de barrido, (DSC), para determinar la forma del estado sólido. Esto se realizó sobre una máquina TA Instruments DSC2920 sobre una temperatura que varía entre 25°C y 300°C, usando nitrógeno como gas de purga con una velocidad de flujo de 20 ml/min. El tipo de cazoleta de la muestra era de aluminio con orificios y el peso de la muestra se determinó el día del análisis en una balanza Mettler M3.

20 Los datos se muestran en la Fig 3. Todas las muestras contienen ADN de plásmido, (10 mg/ml), en sacarosa al 40%. Fig 3A y B: las formulaciones también contienen TrisHCl 100 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, metionina 10 mM y etanol al 2,9%. Las Fig 3A y C representan un ciclo de liofilización de 24 horas; Las Fig 3B y D representan un ciclo de liofilización de 1 hora. La información sugiere que todas las muestras contienen sacarosa amorfá con temperaturas de transición al estado vítreo de la sacarosa observándose a aproximadamente 78°C, (Fig 3A), 85°C, (Fig 3B), 74°C, (Fig 3C) y 63°C, (Fig 3D), que se ajustan bien a los valores publicados en la bibliografía. La información sugiere que tanto los ciclos de liofilización largos como los cortos pueden generar un cristal de sacarosa amorfá. El cristal amorfá se puede formar en presencia de concentraciones elevadas de ADN de plásmido y también en presencia de todos los excipientes descritos. Sin embargo, como no estaba claro si algún material cristalino estaba presente o no en las muestras o se había formado durante el propio análisis por DSC, se analizaron otras muestras por medio de la 25 técnica de la microscopía de luz polarizada para determinar la naturaleza amorfá/cristalina de las muestras.

30

35 *Análisis de formulaciones de ADN de plásmido, liofilizadas, por microscopía de luz polarizada*

40 Las muestras liofilizadas de sacarosa/ADN de plásmido, (\pm excipientes) preparadas para el análisis por DSC, descrito anteriormente, se sometieron a análisis por microscopía de luz polarizada. Las muestras de control se prepararon de simplemente sacarosa al 40%, liofilizada durante ciclos de 1 hora y 24 horas y también se analizaron muestras cristalinas de sacarosa y los principales excipientes sólidos: metionina, Tris HCl y EDTA. Esto fue para comparar y observar la aparición de cualquier material cristalino presente en las formulaciones. El análisis se realizó en un 45 microscopio de luz polarizada Zeiss STD16-444111 con muestras montadas en aceite de inmersión y cubiertas.

40 La información se muestra en la Fig 4, en la que todas las formulaciones contienen ADN de plásmido, (10 mg/ml), en sacarosa al 40%. Fig. 4A: las formulaciones también contienen TrisHCl 100 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, metionina 10 mM y etanol al 2,9%. La Fig 4C: sólo contiene sacarosa al 40% y la Fig 4D: muestra cristales del excipiente sólido principal. 1AM, 2AM y 3AM representan un ciclo de liofilización de 24 horas, mientras que 1ST, 2ST y 3ST representan un ciclo de liofilización de 1 hora.

50 De la Fig. 4C está claro que tanto los ciclos de liofilización de 1 hora como de 24 horas realizados sobre sacarosa sola al 40% generan solamente un cristal amorfó como se espera. De la Fig 4B, la adición de ADN de plásmido (10 mg/ml), a la formulación de sacarosa al 40%, aunque permite en gran medida la formación de un cristal amorfó, posibilita la formación parcial de alguna sacarosa cristalina (las muestras 2AM y 2ST están constituidas por material amorfó con alguna evidencia de partículas cristalinas, que podrían ser sacarosa). Sin embargo, de la Fig 4A, la adición de los excipientes a la formulación de ADN/sacarosa reduce la cantidad de formulación de partículas cristalinas en muestras liofilizadas durante 24 horas (1AM, el grueso de la muestra está constituido por láminas de material amorfó. Hay pocas partículas cristalinas presentes), y para los ciclos cortos de liofilización de 1 horas, no existe evidencia de la 55 formación de partículas cristalinas, simplemente un cristal amorfó. Esto sugiere que la adición de los excipientes descritos al ADN de plásmido en sacarosa ayuda no sólo a mejorar la liberación y estabilidad del ADN de la degeneración sino que también ayuda a preservar el estado del cristal amorfó tras los ciclos cortos de liofilización.

Ejemplo 4

60 *Demostración de la formación de cristal amorfó después de la liofilización de ADN de plásmido en formulaciones diferentes de azúcar/poliol que contienen excipientes*

65 Para determinar si la naturaleza del azúcar/poliol presente en la formulación de ADN de plásmido con excipientes, como se describe anteriormente, afectaba la capacidad de tales formulaciones para generar un cristal amorfó tras la liofilización, se varió el poliol. Se generó, liofilizó y analizó por microscopía de luz polarizada una serie de formulaciones similares que diferían sólo en el poliol presente. Esto se realizó de una forma similar a la descrita en el ejemplo 3, salvo que en esta ocasión se usó un microscopio de luz polarizada Olympus BX51.

ES 2 285 087 T3

La información se muestra en la Fig 5, en la que todas las formulaciones contienen ADN de plásmido liofilizado (pVAC1.OVA), (10 mg/ml), y TrisHCl 100 mM pH 8,0, EDTA 1 mM, metionina 10 mM y etanol al 2,9%. Fig 5A, muestra 1: ficoll al 40% p/v, muestra 2: dextrano al 20% p/v, muestra 3: sacarosa al 40% p/v, muestra 4: maltotriosa al 20% p/v. Fig 5B, muestra 5: lactosa al 20% p/v, muestra 6: maltosa al 30% p/v, muestra 7: glucosa al 40% p/v, muestra 8: trehalosa al 40% p/v. Se observa que todas las muestras descritas y todas las formulaciones analizadas formaron un cristal amorfo poco o ninguna evidencia de material cristalino estando presente. Se observa que la formulación descrita como muestra 2, que contiene dextrano al 20% p/v, mostró subsiguentemente que había precipitado el ADN de plásmido fuera de la solución, por análisis de electroforesis en gel de agarosa, (información no mostrada), y por tanto no sería una formulación preferida. Esta información demuestra que el ADN de plásmido más los excipientes descritos se pueden mantener, cuando se liofilizan, en un estado vítreo amorfo por medio de una diversidad de polioles/azúcares descritos en la bibliografía, (Hatley, R. & Blair, J., (1999), Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 7: 11-19.).

Ejemplo 5

15 Liofilización de formulaciones de Azúcar/Oro/ADN

El objetivo de este estudio fue liofilizar tres formulaciones de ADN basadas en azúcar que contienen partículas de oro. Las formulaciones se formaron como se muestra a continuación;

- 20 • Formulación 1 preparada con Sacarosa al 40%, TrisHCl 100 mM pH 8,0, L-metionina 10 mM y etanol al 2,9%.
- 25 • La Formulación 2 contenía Sacarosa al 10%, TrisHCl 100 mM pH8,0, L-metionina 10 mM y etanol al 2,9%.
- La Formulación 3 se preparó con Trehalosa al 40%, TrisHCl 100 mM pH 8,0, L-metionina 10 mM y etanol al 2,9%.

30 El plásmido de la hepatitis B superenrollado se formuló en cada una de las tres formulaciones en una concentración de 1 mg/ml. Las partículas de oro se añadieron a cada una de las formulaciones en una concentración de 0,5 g por 10 ml de formulación. Las formulaciones se congelaron por medio de la adición gota a gota de cada formulación en nitrógeno líquido. Las perlas congeladas resultantes se transfirieron a viales de 3 ml de secado por congelación. Los viales se secaron por congelación en un secador por congelación DW8 Heto Holten, usando el ciclo que se muestra a continuación.

35

Etapa de ciclo	Temperatura (°C/Vacio (hPa)	Tiempo (horas)
Etapa congelación	A -40°C	Lo más rápido posible
Mantenido	-40°C	3
Secado primario	-38°C/Vacio (0,107 hPa)	8
Secado secundario (rampa)	-38°C a 5°C/Vacio (lo más bajo posible)	11
Secado secundario (rampa)	5°C a 10°C/Vacio (lo más bajo posible)	2
Secado secundario (mantenido)	10°C/Vacio (lo más bajo posible)	2

60 Las muestras secadas por congelación se taponaron en vacío. El vacío se liberó y se sacaron los viales del secador por congelación. Se estableció un estudio de estabilidad acelerada (a 25°C) usando formulaciones de ADN secadas por congelación. El estudio de estabilidad se controló en intervalos semanales usando electroforesis en gel de agarosa teñido con bromuro de etidio.

65 Electroforesis en gel de agarosa

Se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0,6% sobre muestras de estabilidad para determinar un cambio en la conformación de ADN durante el estudio. Cada muestra liofilizada se reconstituyó en agua destilada y se añadió

ES 2 285 087 T3

a su pocillo respectivo del gel de agarosa usando la combinación de muestra siguiente, cargando el tampón y el agua destilada. $2 \mu\text{l}$ de muestra + $16 \mu\text{l}$ de agua destilada + $2 \mu\text{l}$ de tampón de carga.

Se añadieron $20 \mu\text{l}$ de cada muestra al pocillo respectivo del gel. Las muestras se sometieron a electroforesis durante toda una noche a 20 Voltios. El gel sometido a electroforesis se tiñó con bromuro de etidio y se observó bajo UV. Las muestras de estabilidad se analizaron después del almacenamiento durante 1 y 3 semanas a 25°C .

Resultados

Las fotografías de los geles que contienen las muestras de una y tres semanas se muestran en las Fig 6 y 7. La Fig 6: muestra el perfil de ADN en muestras almacenadas a 25°C durante una semana (carril 1 de la izquierda): Carril 1 - marcador 1 kilobase; Carril 2 - Muestra secada por congelación (Formulación 1) a 25°C después de una semana de almacenamiento; Carril 3 - Muestra secada por congelación (Formulación 1) a 5°C después de una semana de almacenamiento - Control; Carril 4 - Muestra secada por congelación (Formulación 2) a 25°C después de una semana de almacenamiento, Carril 5 - Muestra secada por congelación (Formulación 2) a 5°C después de una semana de almacenamiento; Carril 6 - Muestra secada por congelación (Formulación 3) a 25°C después de una semana de almacenamiento; Carril 7 - Muestra secada por congelación (Formulación 3) a 5°C después de una semana de almacenamiento; Carril 8 - Formulación 1 líquida pre-secada por congelación a 5°C ; Carril 9 - Formulación 2 líquida pre-secada por congelación a 5°C ; Carril 10 - Formulación 3 líquida pre-secada por congelación a 5°C ; Carril 11 - plásmido no formulado, GW7000561X (lote A01B30); Carril 12 - Control Negativo secado por congelación de la Formulación 1 que está constituido por diluyente de la Formulación 1 + perlas de oro sin ADN de plásmido.

Los resultados mostraron que:

- No se detectó ningún cambio importante durante cualquiera de las tres formulaciones secadas por congelación (25°C) en comparación con los controles a 5°C . La mayor parte del ADN resultó estar superenrollado aunque también se detectaron cantidades relativamente pequeñas de topoisofomas lineales y en círculo abierto.
- Las formulaciones líquidas pre-secadas por congelación produjeron perfiles de banda similares a las muestras secadas por congelación posteriormente. La cantidad más elevada de fluorescencia detectada en las muestras pre-secadas por congelación se debe probablemente a la concentración más elevada de ADN en éstas.
- No se detectó ninguna diferencia importante en el perfil del ADN entre la formulación y el plásmido no formulado (línea 11).
- Como se espera, no se observaron bandas en el control negativo del carril 12.

La Figura 7 muestra el perfil de ADN de muestras almacenadas a 25°C durante 3 semanas con el Carril 1 de la izquierda: marcador 1 kilobase; Carril 2 - Muestra secada por congelación (Formulación 1) a 25°C después de tres semanas de almacenamiento; Carril 3 - Muestra secada por congelación (Formulación 1) a 5°C después de tres semanas de almacenamiento - Control; Carril 4 - Muestra secada por congelación (Formulación 2) a 25°C después de tres semanas de almacenamiento; Carril 5 - Muestra secada por congelación (Formulación 2) a 5°C después de tres semanas de almacenamiento; Carril 6 - Muestra secada por congelación (Formulación 3) a 25°C después de tres semanas de almacenamiento; Carril 7 - Muestra secada por congelación (Formulación 3) a 5°C después de tres semanas de almacenamiento; Carril 8 - Formulación 1 líquida pre-secada por congelación a 5°C ; Carril 9 - Formulación 2 líquida pre-secada por congelación a 5°C ; Carril 10 - Formulación 3 líquida pre-secada por congelación a 5°C ; Carril 11 - plásmido no formulado; Carril 12 - Control Negativo secado por congelación de la Formulación 1 que está constituido por diluyente de la Formulación 1 + perlas de oro sin ADN de plásmido.

Los resultados mostraron que:

- No se detectó ningún cambio importante en la conformación de ninguna de las tres formulaciones secadas por congelación (25°C) en comparación con los controles a 5°C . La mayor parte del ADN resultó estar superenrollado aunque también se detectaron pequeñas cantidades de isoformas lineales y en círculo abierto.
- Las formulaciones líquidas pre-secadas por congelación produjeron perfiles de ADN similares a las muestras secadas por congelación posteriormente. La cantidad más elevada de fluorescencia detectada en las muestras pre-secadas por congelación se debe probablemente a la concentración más elevada de ADN en éstas.

Conclusiones

En este estudio hemos demostrado que es posible congelar formulaciones secas de ADN basadas en azúcar/oro sin un cambio importante en la conformación de ADN. Además, hemos mostrado que las perlas liofilizadas resultantes estaban estables a 25°C durante un periodo de tres semanas.

REIVINDICACIONES

1. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN, que tiene un elemento central denso revestido con un medio de depósito sólido que contiene el agente farmacéutico de ADN.
- 5 2. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 1, que además comprende un agente estabilizante que inhibe los efectos degenerativos de los radicales libres.
- 10 3. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 2, en la que el agente estabilizante es uno o ambos de un quelante de iones metálicos y un secuestrador de radicales libres.
- 15 4. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 3, en la que el agente quelante de iones metálicos se selecciona del grupo que está constituido por hexafosfato de inositol, tripolifosfato, ácido succínico y málico, ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), tris (hidroximetil) aminometano (TRIS), Desferal, ácido dietilentriaminopentaacético (DTPA) y ácido etilendiaminodiortohidrofenilacético (EDDHA).
- 5 5. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 3, en la que el secuestrador no reductor de radicales libres se selecciona del grupo constituido por etanol, metionina o glutatión.
- 20 6. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 3, en la que el agente estabilizante que inhibe los efectos degenerativos de los radicales libres es, (a) solución de etanol tamponada con fosfato en combinación con metionina o EDTA, (b) EDTA tamponado con Tris en combinación con metionina o etanol (o combinaciones de metionina y etanol).
- 25 7. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el medio de depósito sólido es un poliol amorfo.
- 30 8. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 7, en la que el poliol es un poliol estabilizante.
9. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que el medio de depósito sólido biodegradable es un azúcar.
- 35 10. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 9, en la que el azúcar se selecciona de lactosa, glucosa, sacarosa, rafinosa o trehalosa.
11. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10 en la que el medio de depósito sólido está en forma de un vidrio.
- 40 12. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 11, en la que el medio de depósito sólido está en forma de un vidrio de azúcar.
13. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que el ADN es ADN de plásmido superenrollado.
- 45 14. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 13, en la que el ADN de plásmido superenrollado está estabilizado de tal forma que después de almacenamiento a 37°C durante 4 semanas, más del 50% del ADN permanece en su forma superenrollada.
- 50 15. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 13, en la que el ADN está estabilizado de tal forma que cuando se libera la relación de la forma superenrollada de monómero : dímero es del orden de 0,8 : 1,2.
- 55 16. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que el agente farmacéutico es una vacuna.
17. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 16, en la que el medio de depósito sólido también comprende un adyuvante de vacuna, agente que facilita la transfección, inhibidor de ADNasa o un envenenador de cristal.
- 60 18. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 17, en la que el adyuvante se selecciona del grupo que está constituido por CpG, imidazoquinolinas sintéticas, tucerasol, citocinas, MPL, QS21, QS7 y emulsiones de aceite en agua.
- 65 19. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 1, en la que los elementos centrales densos son microperlas de un diámetro de partícula medio entre 0,5 µm y 10 µm.

ES 2 285 087 T3

20. Forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 19, en la que el elemento central denso es una microperla de oro o de tungsteno.

21. Un procedimiento para la preparación de una forma farmacéutica de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 1, que comprende la preparación de una solución de agente farmacéutico de ADN, medio de depósito y agente estabilizante que inhibe los efectos degenerativos de los radicales libres en un disolvente, seguido del revestimiento de al menos un elemento central denso con dicha solución, y eliminar el disolvente para formar un medio de depósito sólido que contiene el agente farmacéutico y el agente que inhibe los efectos degenerativos de los radicales libres.

10 22. Un procedimiento para la preparación de una forma de dosificación de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 21, en el que el medio de depósito es un azúcar.

15 23. Un procedimiento para la preparación de una forma de dosificación de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 22, en el que la concentración de azúcar antes de secar sobre el elemento de soporte varía entre el 20% y el 40% p/v.

20 24. Un procedimiento para la preparación de una forma de dosificación de un agente farmacéutico de ADN como se reivindica en la reivindicación 23, en el que el disolvente se desmetaliza antes del procedimiento.

25

30

35

40

45

50

55

60

65

FIG 1, pVAC1.OVA

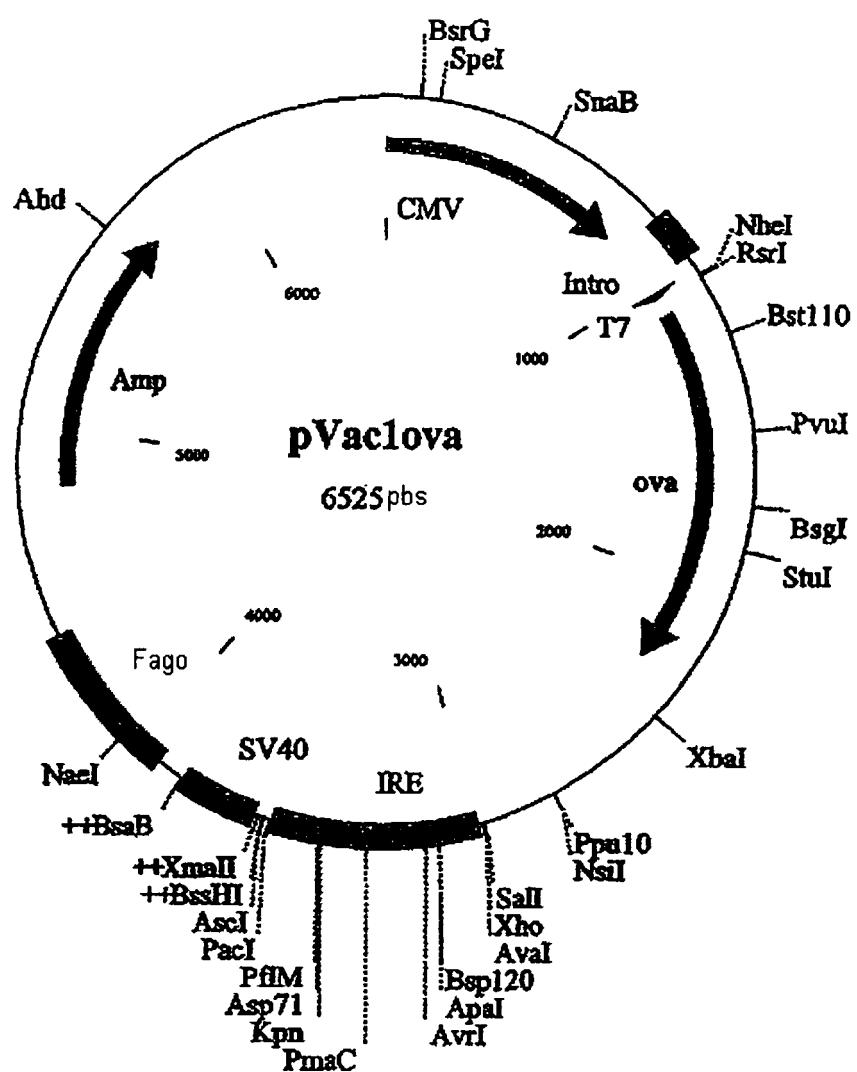


FIG 2A

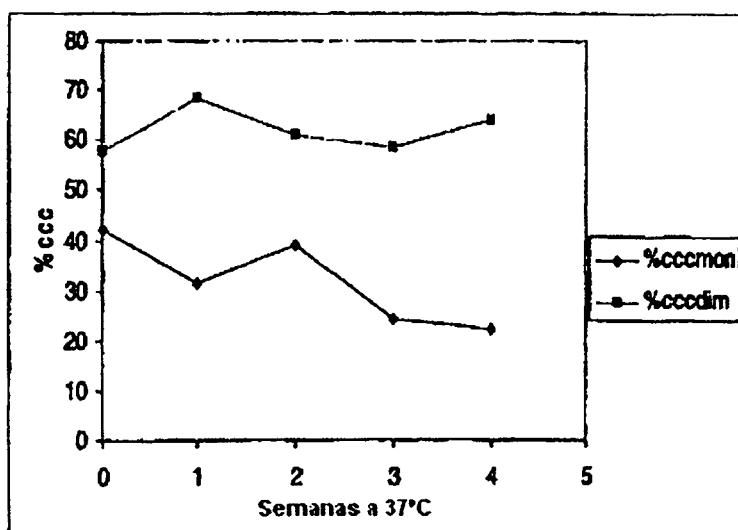


FIG 2B

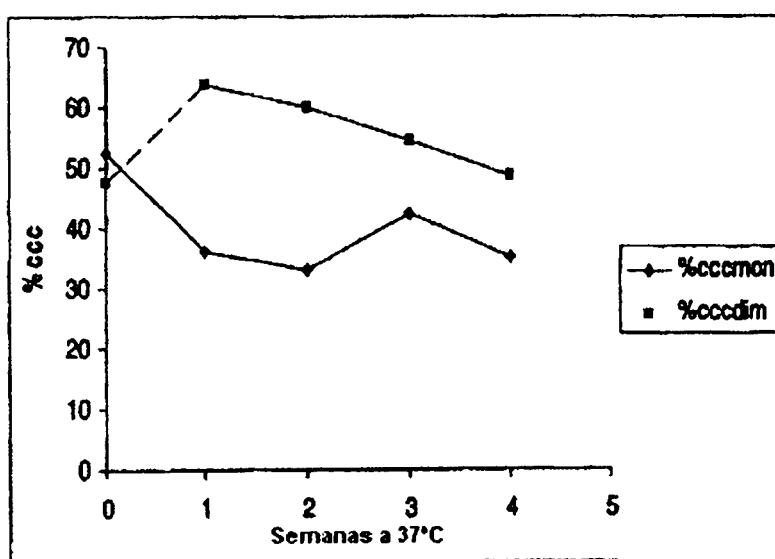


FIG 2C

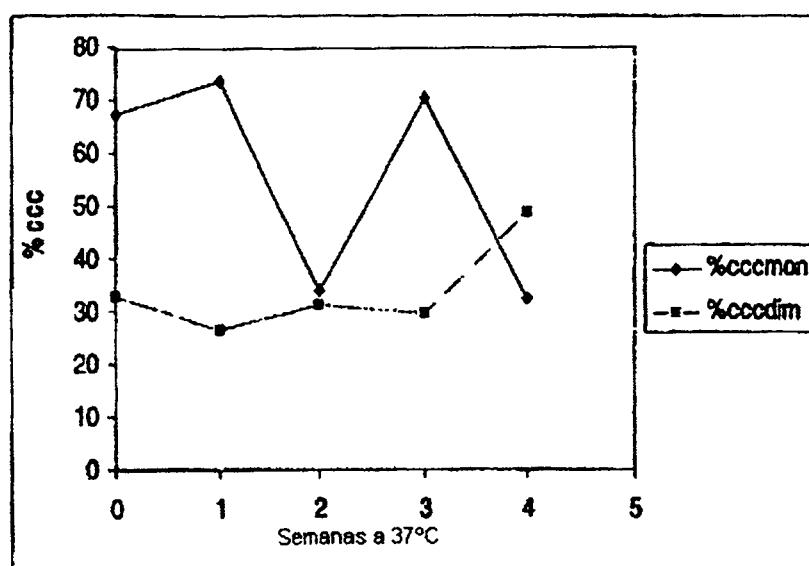
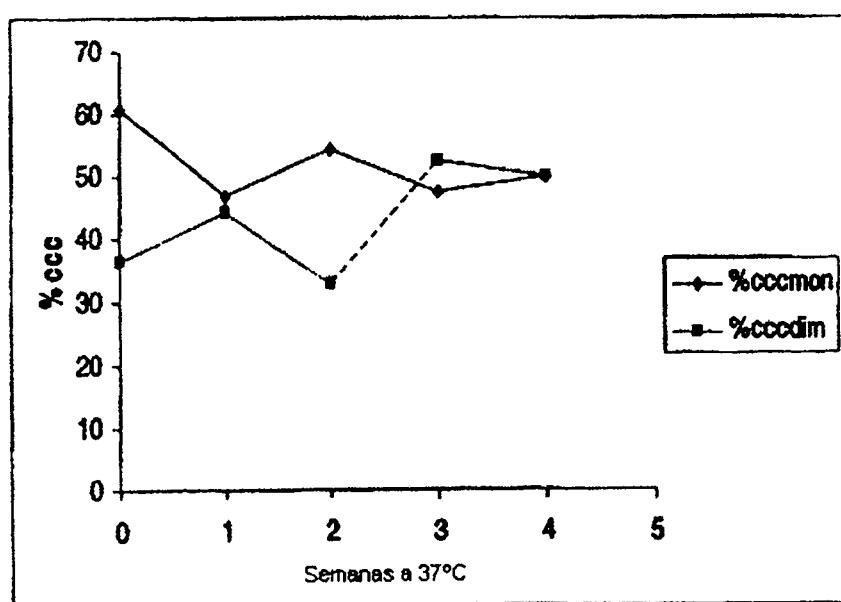


FIG 2D



ES 2 285 087 T3

FIG 2E

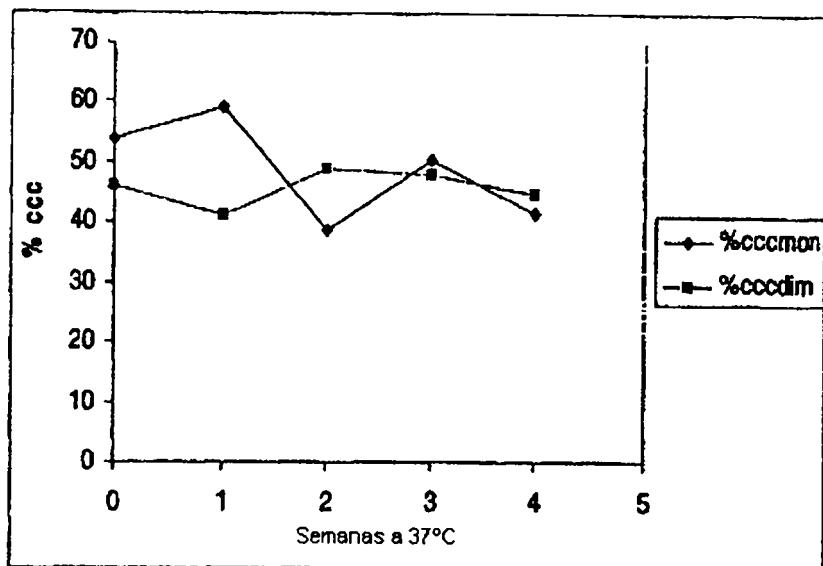


FIG 2F

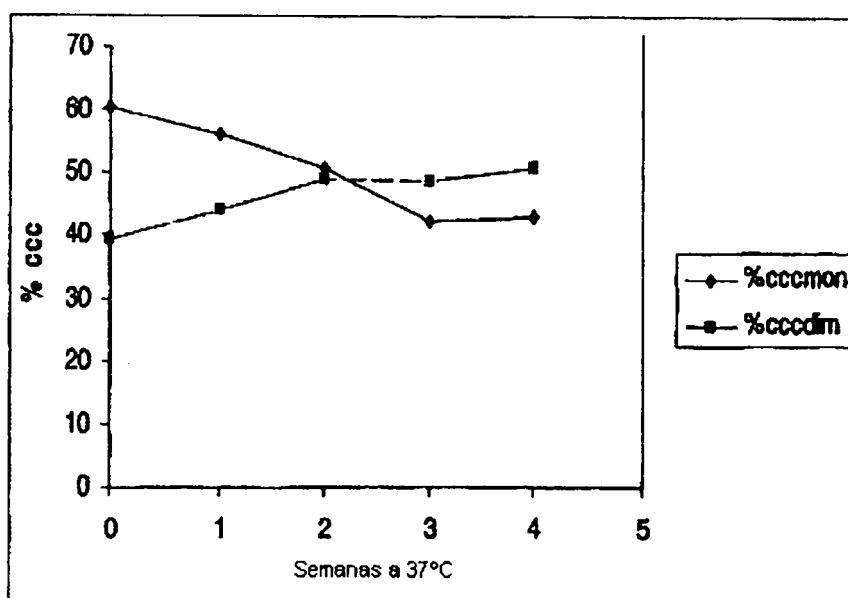


FIG 3A

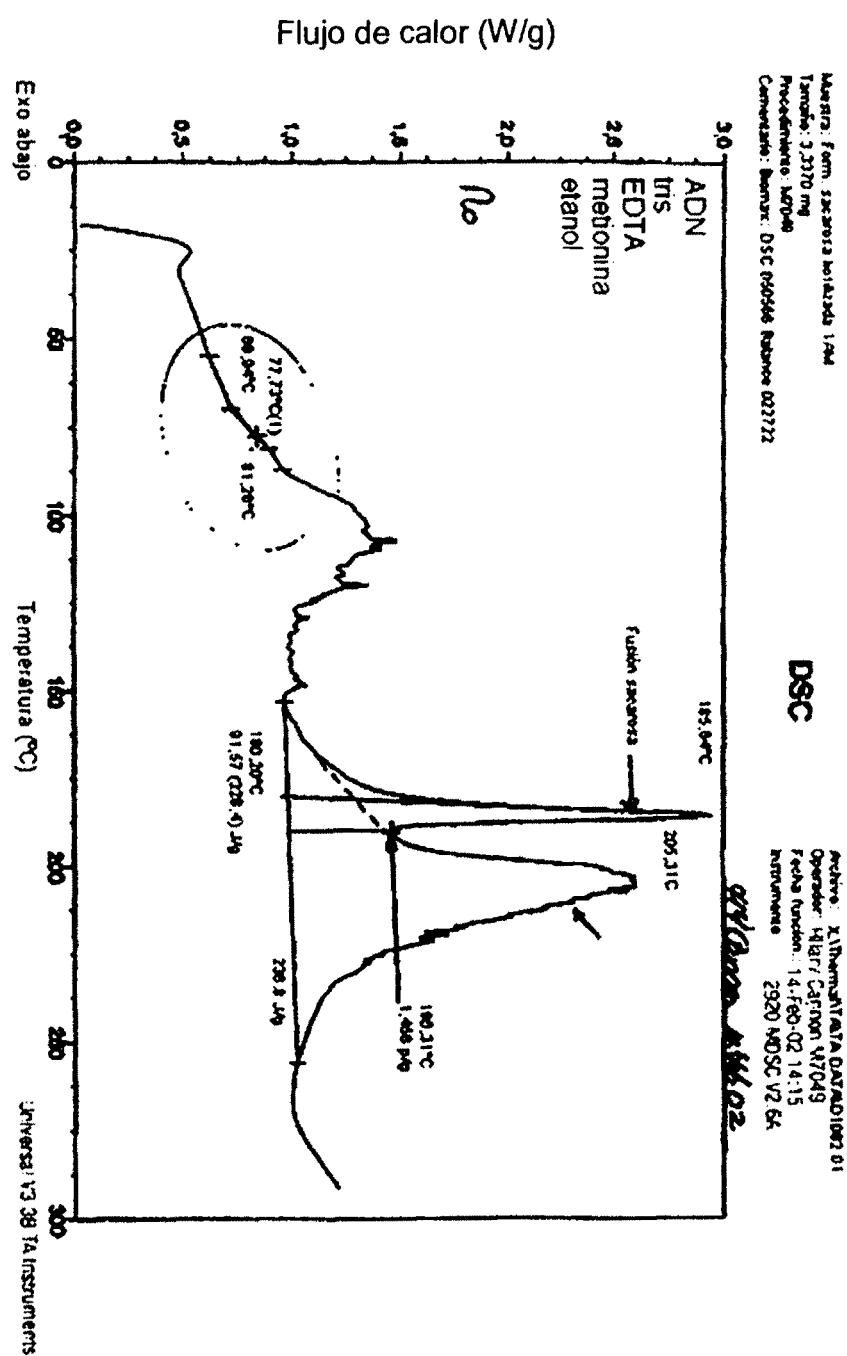


FIG 3B

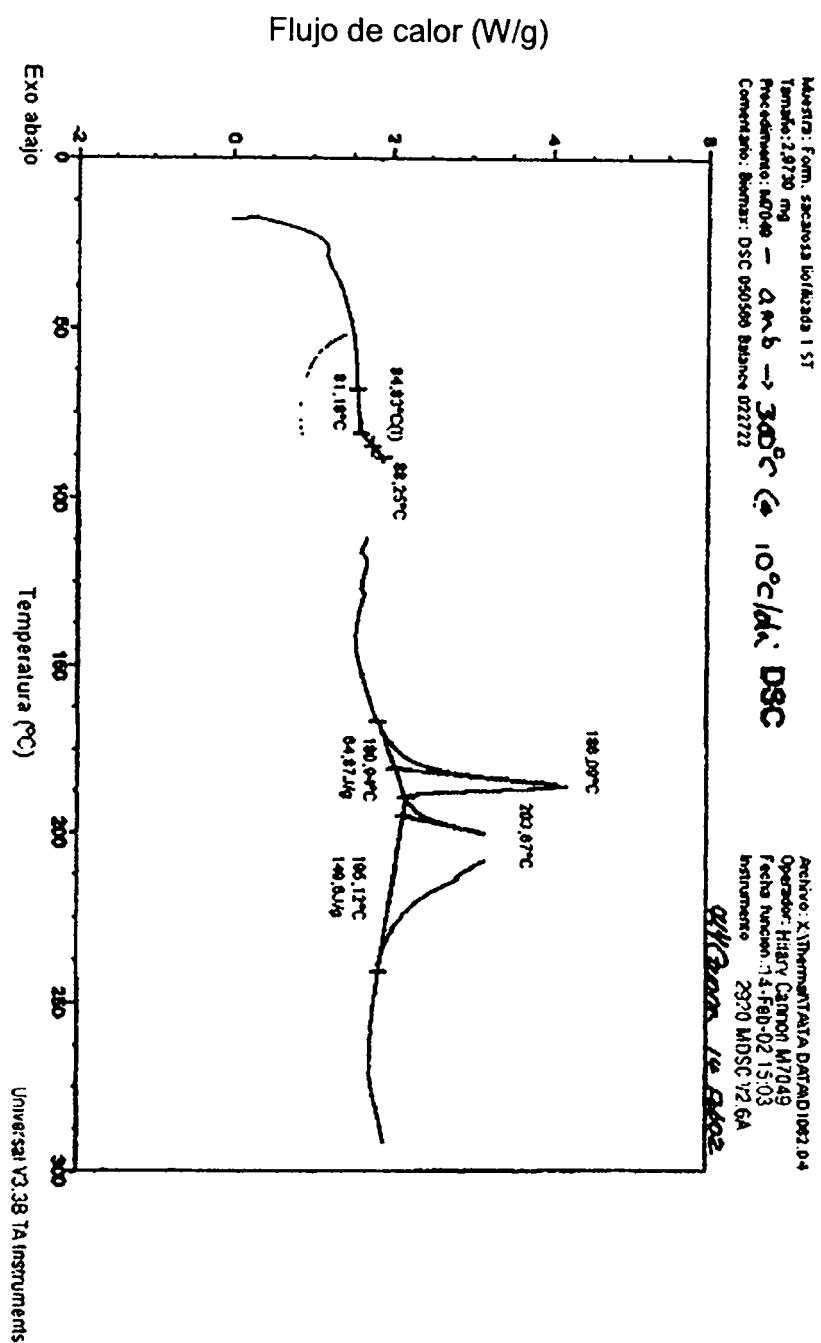


FIG 3C

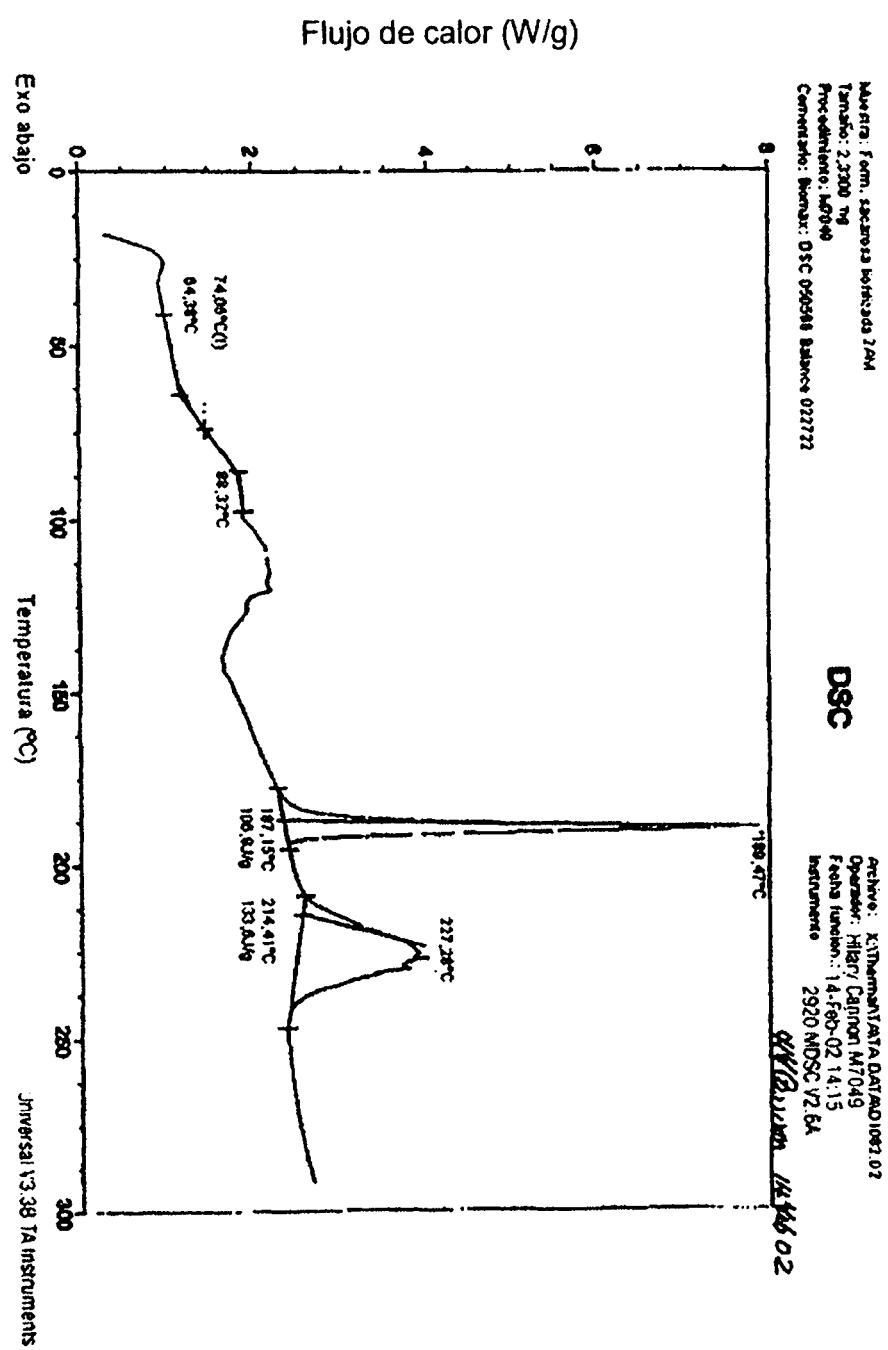


FIG 3D

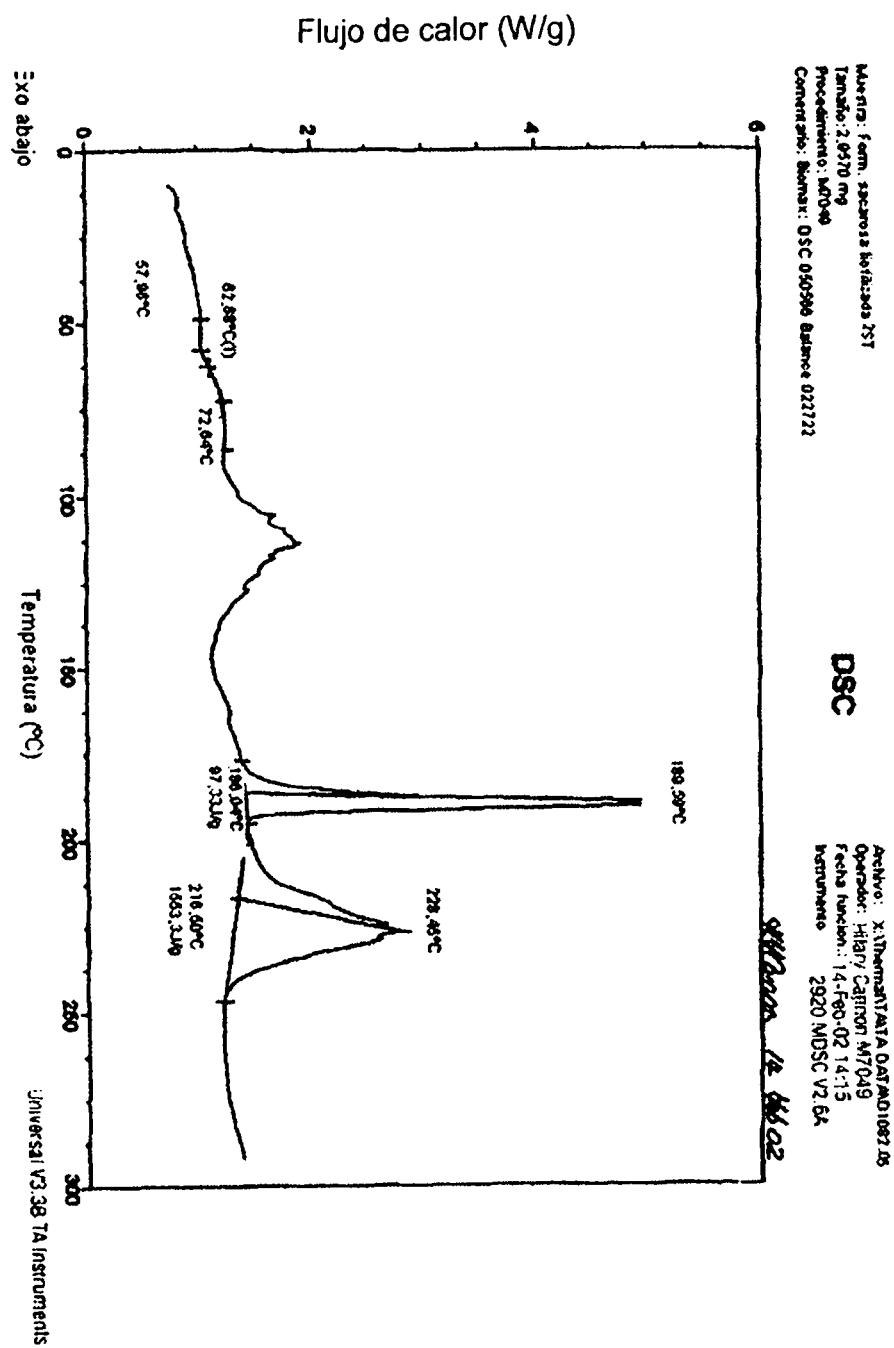


FIG 4A

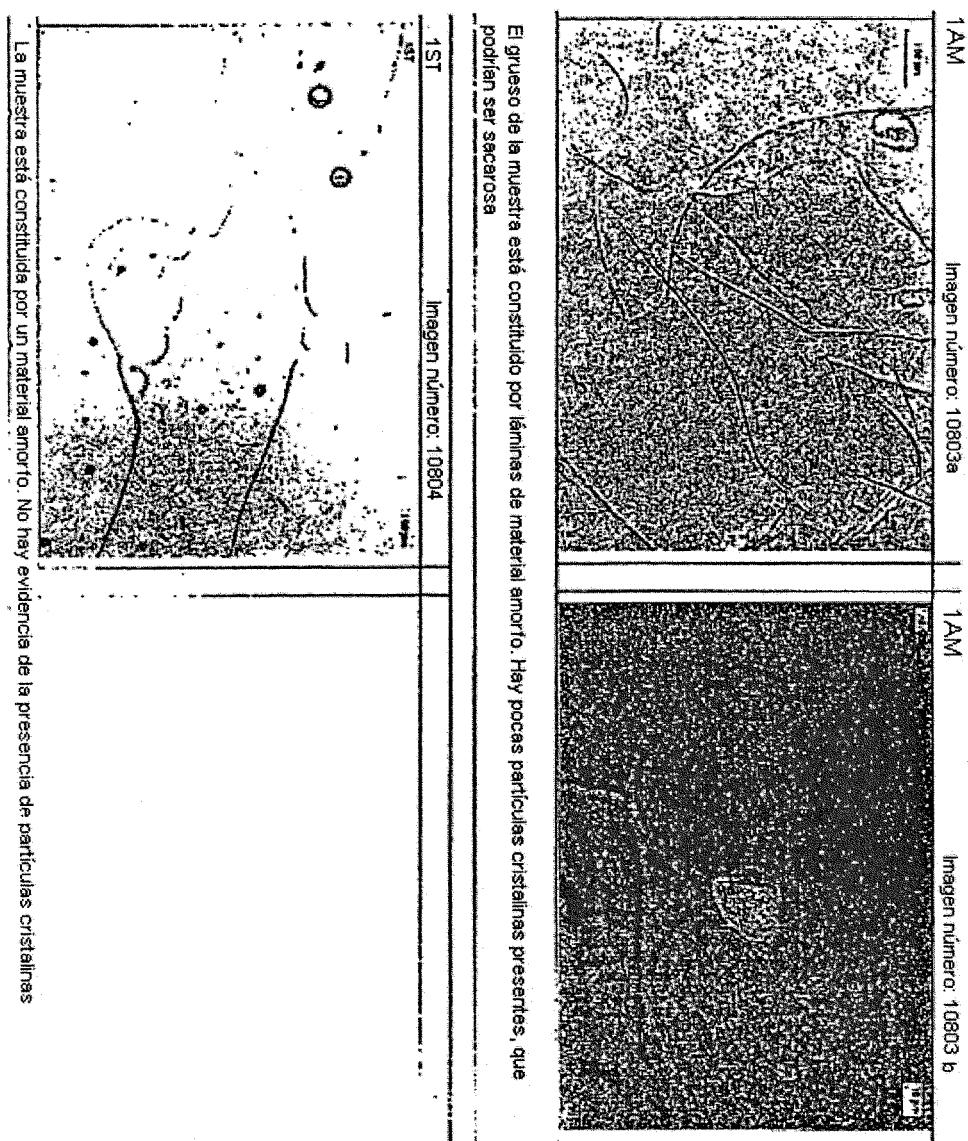


FIG 4B

2 AM	Imagen número: 10805a	2 AM	Imagen número: 10805a
2ST	Imagen número: 10805a	2ST	Imagen número: 10805a
La muestra está constituida por un material amorfo, con evidencia de algunas partículas cristalinas, que podrían ser sacarosa.	La muestra está constituida por un material amorfo, con evidencia de algunas partículas cristalinas, que probablemente sean sacarosa.	La muestra está constituida por un material amorfo, con evidencia de algunas partículas cristalinas, que podrían ser sacarosa.	La muestra está constituida por un material amorfo, con evidencia de algunas partículas cristalinas, que probablemente sean sacarosa.

ES 2 285 087 T3

FIG 4C

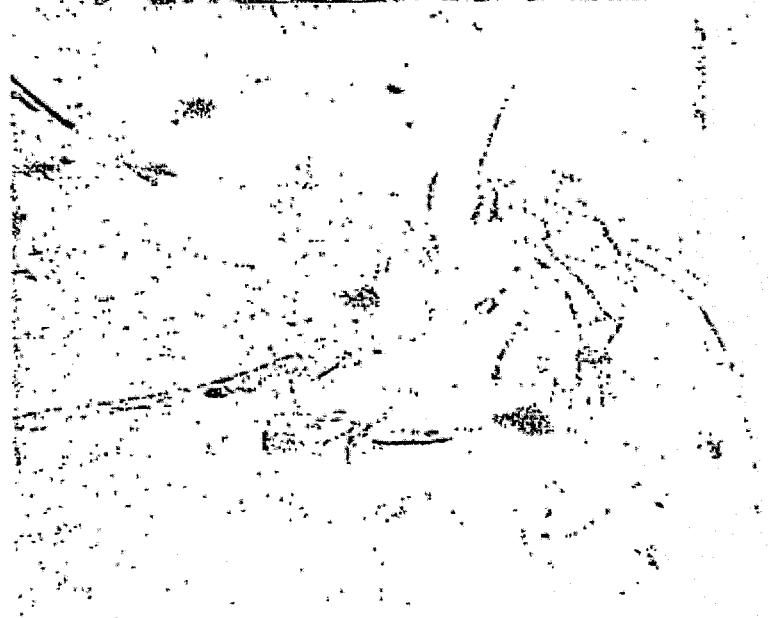


FIG 4D

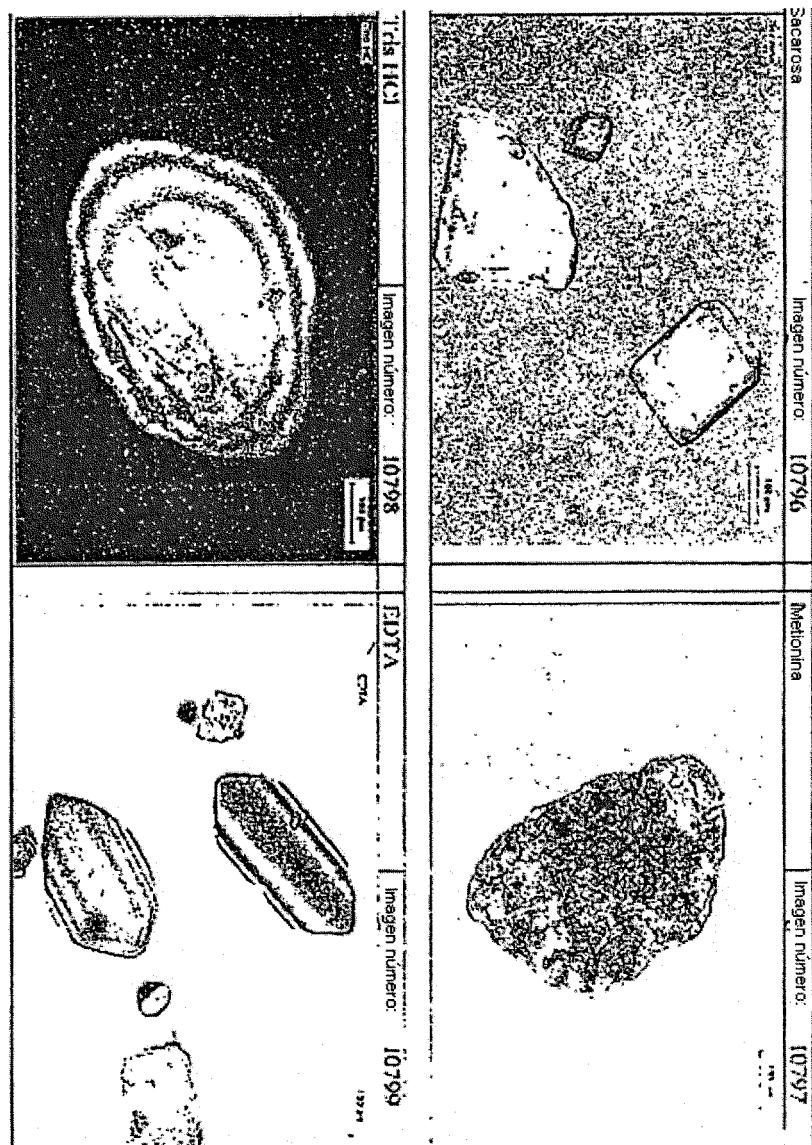


FIG 5A

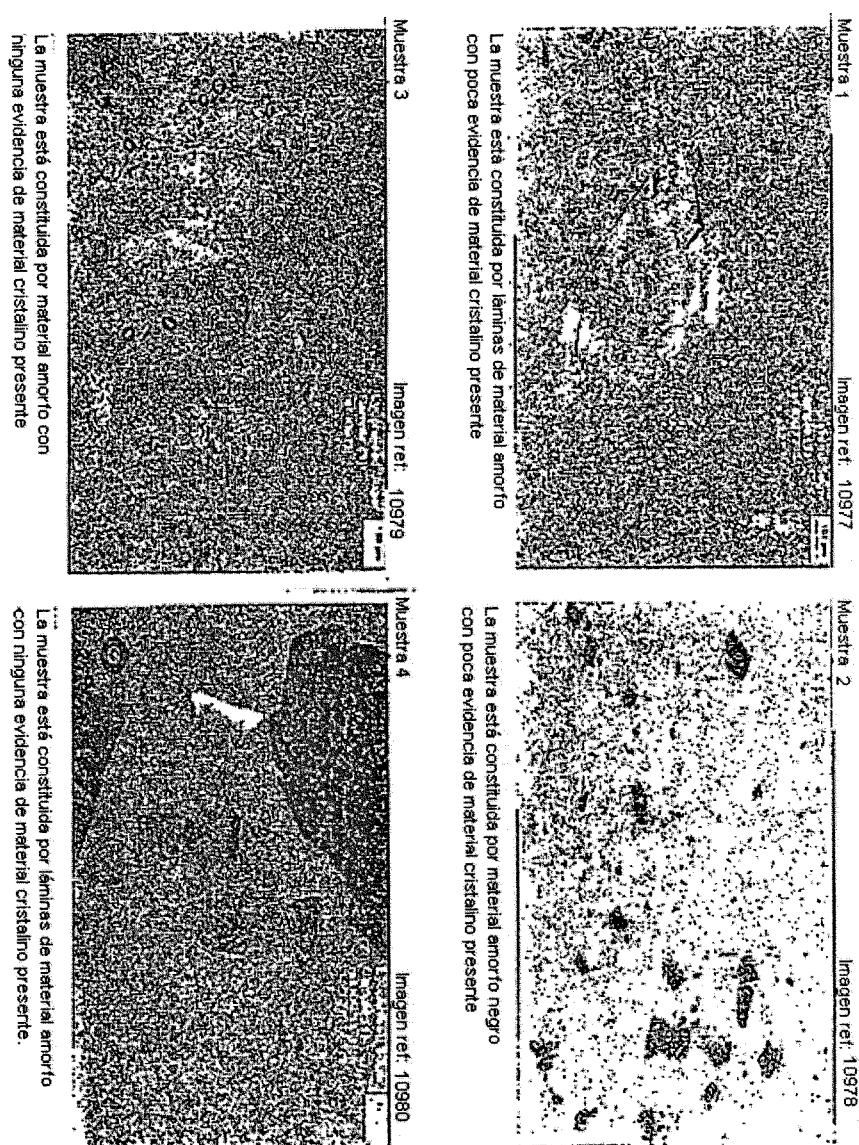
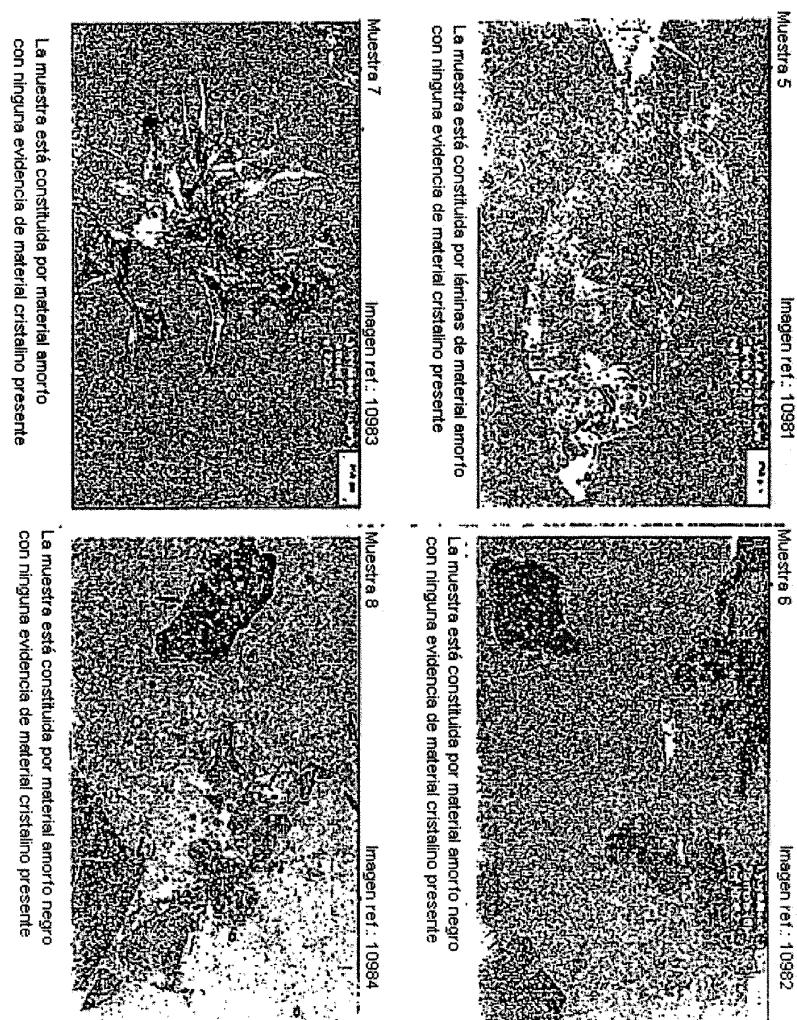


FIG 5B

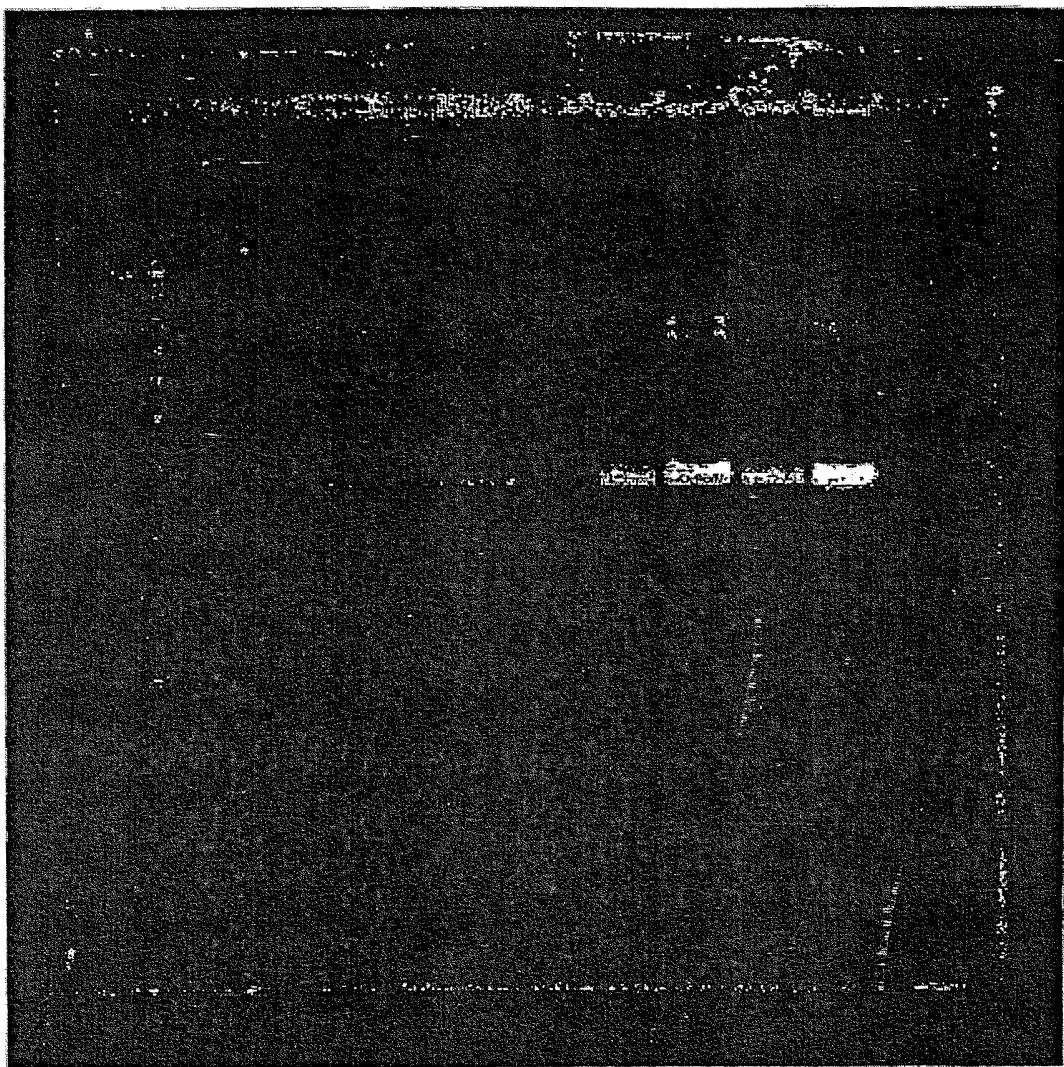


La muestra está constituida por material amorfio
con ninguna evidencia de material cristalino presente

La muestra está constituida por material amorfio negro
con ninguna evidencia de material cristalino presente

ES 2 285 087 T3

FIG 6,



ES 2 285 087 T3

FIG 7,

