



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 603 12 645 T2** 2007.11.29

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 467 711 B1**

(21) Deutsches Aktenzeichen: **603 12 645.6**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/GB03/00336**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **03 700 947.9**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2003/061629**

(86) PCT-Anmeldetag: **23.01.2003**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **31.07.2003**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **20.10.2004**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **21.03.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **29.11.2007**

(51) Int Cl.⁸: **A61K 9/16** (2006.01)
C12N 15/89 (2006.01)

(30) Unionspriorität:

0201735	25.01.2002	GB
0201736	25.01.2002	GB

(73) Patentinhaber:

Glaxo Group Ltd., Greenford, Middlesex, GB

(74) Vertreter:

HOFFMANN & EITLE, 81925 München

(84) Benannte Vertragsstaaten:

**AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB,
GR, HU, IE, IT, LI, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR**

(72) Erfinder:

**CATCHPOLE, Ian Richard, Stevenage,
Hertfordshire, GB**

(54) Bezeichnung: **DARREICHUNGSFORMEN FÜR DNS**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft pharmazeutische DNA-Formulierungen und bevorzugt diejenigen Formulierungen, die zur ballistischen Übertragung in die Haut des menschlichen Körpers geeignet sind. Die vorliegende Erfindung stellt eine neue DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform mit einem dichten Kernelement bereit, das mit einem amorphen festen Reservoirmedium überzogen ist, das das DNA-Pharmazeutikum in fester Lösung oder Suspension darin enthält. Das dichte Kernelement ist bevorzugt eine kleine Metallperle, die zur ballistischen Übertragung des Mittels in eine Zelle geeignet ist; üblicherweise sind solche Perlen annähernd kugelförmige Gold- oder Wolframmikroperlen mit einer durchschnittlichen Teilchengröße im Bereich von 0,5 bis 10 µm Durchmesser. Bevorzugt ist das feste pharmazeutische Reservoirmedium, das die Perlen umhüllt, ein Polyol, bevorzugt ein Polyol in einem amorphen Zustand. Bevorzugt ist das Polyol ein Kohlehydrat wie Trehalose oder Saccharose. Das feste pharmazeutische Reservoirmedium kann ferner ein Stabilisierungsmittel umfassen, das die abbauenden Wirkungen von freien Radikalen inhibiert, wie zum Beispiel ein freier Radikalfänger oder ein Metallionen-Komplexbildner. Die pharmazeutischen DNA-Formulierungen der vorliegenden Erfindung sind lagerstabil, indem die DNA in ihrer Supercoiled-Form stabilisiert ist, und setzen die DNA im wesentlichen nur nach Verabreichung in die Haut frei. Außerdem werden Impfstoffübertragungsvorrichtungen zur Verabreichung der DNA-Impfstoffe in die Haut, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung in der Medizin bereitgestellt.

[0002] Die Haut stellt eine signifikante Barriere gegen äußere Mittel dar. Eine Zusammenfassung über die menschliche Haut wird bereitgestellt in Dorland's Illustrated Medical Dictionary, 28. Auflage. Ausgehend von den äußeren Schichten nach Innen umfaßt die Haut das Epithel, das aus dem Stratum corneum und dem lebensfähigen Epithel besteht, und unter dem Epithel ist die Dermis. Das lebensfähige Epithel besteht aus vier Schichten: Stratum corneum, Stratum lucidum, Stratum granulosum, Stratum spinosum und Stratum basale. Das Epithel (einschließlich aller fünf Schichten) ist die äußerste, nicht-vaskuläre Schicht der Haut und variiert in einer Dicke zwischen 0,07 und 0,12 mm (70-120 µm). Das Epithel ist mit Keratinozyten besiedelt, eine Zelle, die Keratin erzeugt und 95 % der zugehörigen epidermalen Zellen darstellt. Die anderen 5 % Zellen sind Melanozyten. Die darunterliegende Dermis wird normalerweise innerhalb eines Bereiches von 0,3 bis ca. 3 mm unter der Oberfläche des Stratum corneum gefunden und enthält Schweißdrüsen, Haarfollikel, Nervenendigungen und Blutgefäße.

[0003] Das Stratum corneum beherrscht die Hautdurchlässigkeitsbarriere und besteht aus einigen Duzend hornigen, keratinisierten Epithelschichten. Die engen Zwischenräume zwischen den toten oder sterbenden Keratinozyten in dieser Region sind mit kristallinen Lipid-Multilamellen gefüllt. Diese versiegeln effizient die Zwischenräume zwischen der Haut oder dem Körperinneren und der Umgebung, indem eine hydrophobe Barriere gegen den Eintritt von hydrophilen Molekülen bereitgestellt wird. Das Stratum corneum hat eine Dicke im Bereich von 30-70 µm.

[0004] Langerhanssche Zellen werden durchgehend in der basalen granulären Schicht des lebensfähigen Epithels gefunden (Stratum spinosum und Stratum granulosum (Small Animal Dermatology – dritte Auflage, Muller-Kirk-Scott, Hrsg.: Saunders (1983)) und werden als wichtig in der Anfangsverteidigung des Immunsystems gegen eindringende Organismen betrachtet. Diese Schicht der Haut stellt deshalb eine geeignete Zielzone für bestimmte Impfstofftypen dar.

[0005] Herkömmliche Verabreichungsmodi für Pharmazeutika in oder durch die Haut, am üblichsten durch Injektionsnadel und -spritze, sind mit zahlreichen Nachteilen verbunden. Solche Nachteile schließen Schmerz, das Erfordernis für den ausgebildeten Fachmann zur Verabreichung des Mittels und auch das Risiko von Nadelstichverletzungen des Verabreichenden mit dem begleitenden Risiko der Infektion mit einer blutbärtigen Krankheit ein. Als solches besteht ein Bedarf an der Verbesserung des Verabreichungsverfahrens für alle Typen von Pharmazeutika in oder durch die Haut.

[0006] Eine Anzahl alternativer Ansätze wurde beschrieben, um die Probleme der Verabreichung eines Mittels durch das Stratum corneum auszuräumen, einschließlich verschiedener Vorrichtungen für die ballistische Übertragung von Impfstoffen in einer Überschall-Gasströmung.

[0007] DNA-Impfstoffe bestehen gewöhnlich aus einem bakteriellen Plasmidvektor, in den ein starker viraler Promotor, das Gen von Interesse, das für ein antigenes Peptid codiert, und eine Polyadenylierungs/Transkriptionsterminationssequenz inseriert ist. Das Gen von Interesse kann ein vollständiges Protein oder einfach eine antigene Peptidsequenz in bezug auf das Pathogen, den Tumor oder ein anderes Mittel, gegen das geschützt werden soll, codieren. Das Plasmid kann in Bakterien, wie zum Beispiel E. coli, kultiviert und dann isoliert und

in einem geeigneten Medium hergestellt werden, abhängig vom beabsichtigten Verabreichungsweg, vor der Verabreichung an den Wirt. Nach der Verabreichung erzeugen die Wirtszellen das Plasmidcodierte Protein oder Peptid. Die Plasmidvektoren werden allgemein ohne einen Replikationsursprung hergestellt, der funktionell in eukaryontischen Zellen ist, um die Plasmidreplikation im Säugerwirt und die Integration in die chromosomale DNA des betreffenden Tieres zu verhindern. Informationen in bezug auf DNA-Impfung werden bereitgestellt in Donnelly et al. "DNA vaccines", Ann. Rev. Immunol. 1997 15:617-648, dessen Offenbarung hier in seiner Gesamtheit durch Verweis eingeführt wird.

[0008] Die Plasmid-basierte Übertragung von Genen, insbesondere für Immunisierungs- oder Gentherapie-zwecke, ist bekannt. Zum Beispiel wird die Verabreichung von nackter DNA durch Injektion in den Mäusemuskel in WO 90/11092 umrissen. Johnston et al. (WO 91/07487) beschreiben Verfahren zur Übertragung eines Gens auf Wirbeltierzellen durch die Verwendung von Mikroperlen, auf denen ein Polynukleotid, das ein Gen von Interesse codiert, präzipitiert wurde, und zur Beschleunigung der DNA/Mikroperlen, so daß sie in die Zielzelle eindringen. Vorrichtungen zur Verabreichung von Gold- oder Wolframperlen, die mit DNA überzogen sind, in Zellen der Haut werden beschrieben in US 5,630,796; WO 96/04947; WO 96/12513; WO 96/20022; WO 97/34652; WO 97/48485; WO 99/01168; WO 99/01169. Verfahren zur Impfung unter Verwendung von kristallinen Formen von ballistisch übertragenen Pharmazeutika werden in WO 99/27961 beschrieben. Die vorliegende Erfindung stellt verbesserte DNA-Arzneiformen zur Verwendung in nadellosen ballistischen Übertragungsvorrichtungen wie denjenigen bereit, die in den obigen Veröffentlichungen beschrieben werden. Die Formulierungen, worin DNA auf Goldperlen wie im Stand der Technik beschrieben präzipitiert wird, weisen das Problem auf, daß es schwierig ist, die DNA mit zusätzlichen Mitteln/Exzipienten zusammen zu formulieren. Die vorliegende Erfindung stellt ein Verfahren zur Koformulierung zusätzlicher Mittel bereit.

[0009] Feste Arzneiformen, die ein Pharmazeutikum (einschließlich DNA-Plasmide) und ein stabilisierendes Polyol (wie einen Zucker) umfassen, worin die Arzneiformen in Form von ballistisch übertragenen Pulvern sind, werden in WO 96/03978 beschrieben. Die Stabilisierung von Mitteln in amorphen Zuckergläsern wurde in US 5,098,893 beschrieben.

[0010] In pharmazeutischen Formulierungen verwendete Zucker können entweder kristallin oder amorph sein. Amorphe Feststoffe werden von kristallinen durch ihren Mangel an dreidimensionaler Fernordnung unterschieden, die in kristallinen Materialien gefunden wird. Amorphe Feststoffe sind ähnlich Flüssigkeiten auf molekularer Ebene, worin die Moleküle zufällig angeordnet sind. Amorphe Zucker verleihen pharmazeutischen Formulierungen bei Lagerung bei Temperaturen unterhalb der Glasübergangstemperatur Stabilität. Amorphe Zucker weisen eine Eigenschaft auf, in der es eine Veränderung der Mobilität der Moleküle in der Zuckermatrix unterhalb einer als Glasübergangstemperatur bezeichneten Temperatur gibt. Unterhalb dieser Temperatur (T_g) existieren amorphe Zucker in einem glasartigen Zustand und oberhalb dieser Temperatur in einem gummiartigen Zustand. Bei Temperaturen unterhalb T_g ist die Beweglichkeit der Zuckermoleküle und etwaiger Moleküle, die in der Zuckermatrix assoziiert oder gefangen sind, äußerst gering, was zur Langzeitstabilität solcher Formulierungen führt. Mit anderen Worten reduziert die Bildung eines Glases dramatisch die Diffusionsgeschwindigkeiten der Moleküle. Dies ist auch von einer Abnahme der Wärmekapazität bei konstantem Druck (C_p) um 40 bis 100 % begleitet. Dieser Übergang kann leicht durch empfindliche thermische Techniken wie die Differentialrasterkalorimetrie beobachtet werden (S.P. Duddu, G. Zhang und P.R. Dal Monte, 1997, Pharm. Res. 14: 596-600). Die stabilisierenden Eigenschaften von Zuckern wurden ebenfalls ihren Wasserstoff-bindenden Eigenschaften mit biologischen Molekülen wie Proteinen zugeschrieben.

[0011] Es ist wünschenswert für DNA-Pharmazeutika, in einer Supercoiled-Form übertragen zu werden. Supercoiled-DNA in flüssigen pharmazeutischen Zubereitungen ist dafür bekannt, sich im Zeitverlauf abzubauen, was zum Verlust der Supercoiled-Struktur und der assoziierten Bildung von offenen, kreisförmigen oder linearen DNA-Strukturen führt (Evans et al., 2000, Journal of Pharmaceutical Sciences, 89(1), 76-87; WO 97/40839). Ein Mechanismus, durch den diese Kettenspaltungsreaktion auftreten kann, ist die Oxidation der DNA durch freie Hydroxylradikale, die aus gelöstem Sauerstoff in den DNA-Lösungen erzeugt werden, ein Prozeß, der durch Metallionen katalysiert wird. Die Bildungsreaktion von freien Radikalen kann durch verschiedene Übergangsmetallionen katalysiert werden, deren häufigste jedoch Eisen- und Kupferionen sind (Fe^{+3} , Fe^{+2} , Cu^{+2} oder Cu^{+1} Evans et al., s.o.).

[0012] Die Instabilität von Supercoiled-DNA ist offensichtlich, wenn die DNA in flüssiger Lösung ist. Jedoch stabilisiert die Entfernung von Spurenmetallionen aus Supercoiled-DNA enthaltenden flüssigen Lösungen mit Metallionen-Komplexbildnern und/oder das Vernichten von freien Radikalen in Lösung durch nicht-reduzierende freie Radikalfänger die DNA in der Supercoiled-Form und schützt die DNA vor Oxidation (WO 97/40839). Das Stabilisierungsproblem von trockenen Formen von DNA, sobald sie auf Gold- oder Wolframperlen aufge-

tragen ist, wurde bis jetzt noch nicht auf diesem Gebiet angegangen. Überraschend haben die vorliegenden Erfinder beobachtet, daß trockene Formen von DNA ohne die Technologie der vorliegenden Erfindung, wenn sie auf Gold- oder Wolframmikroperlen aufgetragen ist, ebenfalls instabil sind.

[0013] Die vorliegende Erfindung räumt diese Probleme aus und stellt eine DNA-übertragungsdosis bereit, die die DNA-Mittel effizient in die Haut verabreichen und freisetzen kann, mit oder ohne zusätzliche Exzipienten, und worin auch die DNA in ihrer Supercoiled-Form stabilisiert ist.

Beschreibung der Figuren

[0014] [Fig. 1](#), pVAC1.ova

[0015] [Fig. 2](#) zeigt eine graphische Auftragung des Prozentanteils von Supercoiled-Plasmid (%ccc), sowohl in monomeren (%cccmom) als auch dimeren (%cccdim) Plasmidformen; nach Auftragung und Lyophilisierung auf Impfnadeln und Lagerung bei 37°C. Die verwendeten Plasmidformulierungen enthalten variierende Mengen von Zuckern: [Fig. 2A](#): 5 % Saccharose, [Fig. 2B](#): 10 % Saccharose, [Fig. 2C](#): 17,5 % Saccharose, [Fig. 2D](#): 40 % Saccharose, [Fig. 2E](#): 40 % Trehalose, [Fig. 2F](#): 40 % Glucose.

[0016] [Fig. 3](#) zeigt Differentialrasterkalorimetrie-(DSC)-Daten für Formulierungen von Plasmid-DNA (10 mg/ml) in 40%iger Saccharose. [Fig. 3A](#) und B: die Formulierungen enthalten ebenfalls: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 10 mM Methionin und 2,9 % Ethanol; [Fig. 3A](#) und C stellen einen 24-stündigen Lyophilisierungszyklus dar; [Fig. 3B](#) und D stellen einen 1-stündigen Lyophilisierungszyklus dar.

[0017] [Fig. 4](#) zeigt Mikroskopiedaten mit polarisiertem Licht für Formulierungen von Plasmid-DNA (10 mg/ml) in 40%iger Saccharose. [Fig. 4A](#): die Formulierungen enthalten ebenfalls: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 10 mM Methionin und 2,9 % Ethanol; [Fig. 4C](#): enthält nur 40 % Saccharose; und [Fig. 4D](#): zeigt Kristalle der in der in [Fig. 4A](#) gezeigten Formulierung beschriebenen Exzipienten. 1AM, 2AM und 3AM stellen einen 24-stündigen Lyophilisierungszyklus dar, wohingegen 1ST, 2ST und 3ST einen 1-stündigen Lyophilisierungszyklus darstellen.

[0018] [Fig. 5](#) zeigt Mikroskopiedaten mit polarisiertem Licht für lyophilisierte Formulierungen von Plasmid-DNA (10 mg/ml) in Zuckern und Polyolen, die auch enthalten: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 10 mM Methionin und 2,9 % Ethanol. [Fig. 5A](#), Probe 1: 40 % G/V Ficoll, Probe 2: 20 % G/V Dextran, Probe 3: 40 % G/V Saccharose, Probe 4: 20 % G/V Maltotriose. [Fig. 5B](#), Probe 5: 20 % G/V Lactose, Probe 6: 30 % G/V Maltose, Probe 7: 40 % G/V Glucose, Probe 8: 40 % G/V Trehalose.

[0019] [Fig. 6](#) zeigt die Stabilität von Supercoiled-DNA-Plasmid, das auf Goldperlen aufgetragen und für 1 Woche bei 25°C gelagert wurde.

[0020] [Fig. 7](#) zeigt die Stabilität von Supercoiled-DNA-Plasmid, das auf Goldperlen aufgetragen und für 3 Wochen bei 25°C gelagert wurde.

[0021] Die vorliegende Erfindung stellt eine neue DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform mit einem dichten Kernelement bereit, das mit einem festen Reservoirmedium überzogen ist, das das DNA-Pharmazeutikum enthält.

[0022] DNA-Impfstoffarzneiformen sind ein bevorzugter Aspekt der vorliegenden Erfindung. In solchen Anwendungen ist das zu übertragende Mittel ein Polynukleotid, das ein Antigen oder Antigene codiert, die aus einem Pathogen wie Mikroorganismen oder Viren ableitbar sind, oder kann ein Selbstantigen im Fall eines Krebsimpfstoffs oder anderes Selbstantigen sein.

[0023] Die DNA-Komponente der vorliegenden Erfindung kann lineare oder offene ringförmige oder supercoiled Plasmid-DNA sein, aber in einer verwandten Form der vorliegenden Erfindung kann die DNA in Form eines lebend abgeschwächten bakteriellen oder viralen Vektors sein.

[0024] Bestimmte Ausführungsformen der hier beschriebenen Vorrichtung weisen auch den signifikanten Vorteil der Lagerung bei Raumtemperatur auf, wodurch logistische Kosten reduziert und wertvoller Gefrierraum für andere Produkte freigesetzt wird.

[0025] Das feste amorphe Reservoirmedium ist bevorzugt ein Polyol, das die für die vorliegende Erfindung erforderliche Funktion erfüllt. Das Reservoir muß an der Mikroperle in einem ausreichenden Ausmaß anhaften

können, so daß das Reservoir während anhaltender Lagerung physikalisch stabil und angeheftet bleibt und auch im wesentlichen intakt während des Verabreichungsverfahrens bleibt, wenn die überzogene Mikroperle durch das Stratum corneum projiziert wird. Das Reservoir muß auch eine Suspension oder Lösung von zu übertragendem Mittel in einer trockenen oder teilweise trockenen Form halten oder enthalten können, die in die Haut während des biologischen Abbaus des Reservoirmediums freigesetzt wird.

[0026] Der biologische Abbau des Mediums im Sinne der vorliegenden Erfindung bedeutet, daß das Reservoirmedium den Zustand verändert, so daß es von seinem nicht-freisetzenden zu seinem freisetzenden Zustand wechselt, wodurch das Mittel in die Haut eintritt. Die Freisetzung des aktiven Mittels kann einen oder mehrere physikalische und/oder chemische Prozesse wie Hydratisierung, Diffusion, Phasentrennung, Kristallisation, Auflösung, enzymatische Reaktion und/oder chemische Reaktion beinhalten. Abhängig von der Wahl des Reservoirmediums kann der biologische Abbau durch eines oder mehrere der folgenden induziert werden: Wasser, Körperflüssigkeiten, Feuchtigkeit, Körpertemperatur, Enzyme, Katalysatoren und/oder Reaktanden. Die Veränderung des Reservoirmediums kann deshalb durch Hydratisierung und die mit der höheren Feuchtigkeit und Temperatur der Haut assoziierte Erwärmung induziert werden. Das Reservoirmedium kann sich dann durch Auflösung und/oder Quellung und/oder Phasenveränderung (kristallin oder amorph) abbauen, wodurch es zerfällt oder bloß die Permeation des Mediums erhöht.

[0027] Bevorzugt löst sich das Medium und wird vom Körper metabolisiert oder ausgestoßen oder abgesondert, aber das Reservoir kann alternativ an der Mikroperle angeheftet bleiben, die aus dem Körper durch mehrere Mechanismen ausgestoßen werden kann, die das Ablösen von toten Hautzellen während des normalen Hautaustauschs einschließen. Die Freisetzung des Mittels durch Auflösung des Reservoirmediums ist bevorzugt.

[0028] Bevorzugt ist das feste Reservoirmedium ein Polyol (wie die in WO 96/03978 beschriebenen). Geeignete Polyol-Reservoirmedien schließen Kohlehydrate (wie Zucker), Polysaccharide, substituierte Polyole wie hydrophobisch derivatisierte Kohlehydrate, Aminosäuren, biologisch abbaubare Polymere oder Copolymere wie Poly(hydroxysäuren), Polyanhydride, Poly(ortho)ester, Polyurethane, Poly(buttersäuren), Poly(valeriansäuren) und Poly(lactid-co-caprolactone) oder Polylactid-co-glycolid ein.

[0029] Das gesamte Reservoir kann in einem amorphen oder kristallinen Zustand sein und kann auch teilweise amorph und teilweise kristallin sein. Am meisten bevorzugt ist jedoch das gesamte oder im wesentlichen gesamte Reservoir in einem amorphen Zustand. Besonders bevorzugt ist es, daß das amorphe Reservoir in Form eines Glases ist (US 5,098,893). Am meisten bevorzugt ist das Reservoir ein Zuckerglas. Ein Glasreservoir kann jede Glasübergangstemperatur aufweisen, aber bevorzugt hat es eine Glasübergangstemperatur, die sowohl das Pharmazeutikum während der Lagerung stabilisiert als auch die schnelle Freisetzung des Mittels nach der Insertion des Reservoirs in die Haut erleichtert. Entsprechend ist die Glasübergangstemperatur größer als 30-40°C, aber ist am meisten bevorzugt etwa Körpertemperatur (wie zum Beispiel (ohne Beschränkung) 40-50°C).

[0030] Besonders bevorzugte Reservoirmedien sind diejenigen, die das zu übertragende Mittel über den Lagerzeitraum stabilisieren. Zum Beispiel ist Antigen oder Mittel, das in einem Polyolglas gelöst oder dispergiert oder einfach in einem Polyol getrocknet ist, lagerstabil über ausgedehnte Zeiträume (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). Solche Polyole bilden den bevorzugten Satz von Reservoirmedien.

[0031] Bevorzugte Polyole schließen Zucker ein, einschließlich Mono-, Di-, Tri- oder Oligosacchariden und ihrer entsprechenden Zuckeralkohole. Geeignete Zucker zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung sind allgemein fachbekannt und schließen Trehalose, Saccharose, Lactose, Fructose, Galactose, Glucose, Mannose, Maltulose, Isomaltulose und Lactulose, Maltose oder Dextrose und Zuckeralkohole der zuvor genannten wie Mannit, Lactit und Maltit ein. Saccharose, Glucose, Lactose, Raffinose und Trehalose sind bevorzugt.

[0032] Die Reservoirmedien der vorliegenden Erfindung können ferner ein Stabilisierungsmittel enthalten, das die abbauenden Wirkungen freier Radikale inhibiert. Bevorzugte Stabilisierungsmittel schließen stabilisierende Metallionen-Komplexbildner ein; solche bevorzugten Metallionen-Komplexbildner schließen Inosithexaphosphat, Tripolyphosphat, Bernstein- und Äpfelsäure, Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), Tromethamin (IRIS), Desferal, Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) und Ethylendiamindihydroxyphenylessigsäure (ED-DHA) ein. Andere bevorzugte Stabilisierungsmittel sind nicht-reduzierende freie Radikalfänger, und solche Mittel sind bevorzugt Ethanol, Methionin oder Glutathion. Andere geeignete Komplexbildner und Radikalfänger (und diejenigen, die nicht geeignet sind) können leicht durch den Fachmann durch Routineexperimente iden-

tifiziert werden (wie in WO 97/40839 beschrieben).

[0033] Die bevorzugten festen Reservoirmedien in den Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung enthalten einen Metallionen-Komplexbildner oder einen nicht-reduzierenden freien Radikalfänger. Am meisten bevorzugt enthalten die festen Reservoirmedien in den Vorrichtungen der vorliegenden Erfindung sowohl einen Metallionen-Komplexbildner als auch einen nichtreduzierenden freien Radikalfänger.

[0034] Die Mengen der Stabilisierungsmittel können durch den Fachmann bestimmt werden, aber sind allgemein im Bereich von 0,1-10 mM für die Metallionen-Komplexbildner. Ethanol ist in einer Menge von bis zu ca. 5 % (V/V) vorhanden, Methionin ist mit ca. 0,1 bis 100 mM vorhanden, und Glutathion ist mit ca. 0,1 bis 10 % (V/V) vorhanden.

[0035] Bevorzugte Kombinationen von Stabilisierungsmitteln sind (a) Phosphat-gepufferte EthanolLösung in Kombination mit Methionin oder EDTA, (b) Tris-gepuffertes EDTA in Kombination mit Methionin oder Ethanol (oder Kombinationen aus Methionin und Ethanol).

[0036] Besonders bevorzugte Formulierungen, die mit DNA kombiniert und auf die dichten Kernelemente zur Bildung von festen Arzneiformen der vorliegenden Erfindung aufgetragen werden können, enthalten Polyole (bevorzugt Saccharose oder Trehalose), die in entmetallisiertem Wasser oder Phosphat- oder Tris-basierten Puffern gelöst sind und ferner folgendes umfassen:

- A. 10 mM Methionin und 2,9 % Ethanol oder
- B. 3,7 % Ethanol und 1 mM EDTA oder
- C. 100 mM Tris, 1 mM EDTA und 10 mM Methionin und 2,9 % Ethanol oder
- D. 100 mM Tris, 1 mM EDTA und 10 mM Methionin oder
- E. 100 mM Tris, 10 mM EDTA und 2,9 % Ethanol.

[0037] In den bevorzugten Verfahren zur Herstellung der vorliegenden Erfindung wird die DNA in diesen Stabilisierungsmitteln vor der letztlichen Formulierung mit dem Zucker gelagert und gehandhabt.

[0038] Zusätzlich zu diesen Stabilisierungsmitteln können weitere Schritte zur Steigerung der Stabilität der DNA in den festen Impfstoffen unternommen werden. Zum Beispiel können die Formulierungen unter Verwendung von Lösungen hergestellt werden, die selbst vor der Verwendung entmetallisiert wurden (zum Beispiel durch Verwendung von handelsüblichem Entmetallisierungsharz wie Chelex 100 von Biorad), und/oder die Formulierung kann in einem hohen pH (wie pH 8-10) fertiggestellt werden.

[0039] Bevorzugt ist die DNA in Form eines Supercoiled-Plasmids. Ein Hauptvorteil der vorliegenden Erfindung für diese Formulierungen ist die Tatsache, daß die DNA stabilisiert ist, so daß sie bei Freisetzung weitgehend in ihrer Supercoiled-Form und bevorzugt in ihrer monomeren Supercoiled-Form verbleibt.

[0040] Plasmid-DNA-Stabilität kann in einer Reihe von Weisen definiert werden und kann ein relatives Phänomen sein, das durch die Lagerungsbedingungen wie pH, Feuchtigkeit und Temperatur bestimmt wird. Zur Lagerung in Gegenwart von Eisenionen auf dem überzogenen Reservoir bleiben bevorzugt >50 % des Plasmids supercoiled (ccc, kovalent geschlossen ringförmig), bei Lagerung für 3 Monate bei 4°C. Besonders bevorzugt bleiben unter den beschriebenen Lagerungsbedingungen >60 % des Plasmids ccc, und besonders bevorzugt bleiben unter diesen Lagerungsbedingungen >90 % des Plasmids ccc für 3 Monate bei 4°C. Für die Beschichtung auf Nicht-Metallionen-basierten Nadeln oder Mikronadeln wäre die Stabilität von Plasmid-DNA bevorzugt >60 % und besonders bevorzugt 80 % und am meisten bevorzugt >90 % ccc nach 3 Monaten Lagerung bei 4°C. Besonders bevorzugt bleiben unter diesen Lagerungsbedingungen >90 % des Plasmids ccc für 1 Jahr bei 4°C, und besonders bevorzugt bleiben >90 % des Plasmid ccc für 2 Jahre bei 4°C. Am meisten bevorzugt wird die obige DNA-Stabilität unter diesen Bedingungen über die gleichen Zeiträume bei 25°C erreicht.

[0041] Die DNA innerhalb des festen Reservoirmediums (zur Einfachheit der Messung bei Auftragung auf Impfnadeln) wird bevorzugt in ihrer Supercoiled-(ccc)-Form während beschleunigter Stabilitätsuntersuchungen stabilisiert, und am meisten bevorzugt wird die DNA in ihrer monomeren ccc-Form stabilisiert. Ein Beispiel für eine beschleunigte Stabilitätsuntersuchung ist, wenn trockene beschichtete Nadeln bei 37°C für 4 Wochen aufbewahrt werden, gefolgt von der Analyse der DNA-Struktur im Zeitverlauf. In dieser Art von Untersuchung bleiben bevorzugt mehr als 50 % der DNA in ihrer ccc-Form, besonders bevorzugt bleiben mehr als 60 % in ihrer ccc-Form, besonders bevorzugt bleiben mehr als 70 % in ihrer ccc-Form, besonders bevorzugt bleiben mehr als 80 % in ihrer ccc-Form und am meisten bevorzugt bleiben mehr als 90 % in ihrer ccc-Form. Unter

diesen Bedingungen und bevorzugten Mengen von ccc ist es auch bevorzugt, daß das Verhältnis monomere:dimere ccc-DNA ca. 1 (wie im Bereich von 0,8-1,2 oder besonders bevorzugt im Bereich von 0,9-1,1 und am meisten bevorzugt im Bereich von 0,95-1,5) oder größer als 1 ist.

[0042] Untersuchungen zur Bestimmung von Plasmidstabilität sind den Fachleuten wohlbekannt und werden beschrieben in Evans et al., s.o.; WO 97/40839. Diese schließen Techniken zur Messung und Quantifizierung des Prozentanteils von Supercoiled-(ccc)-plasmid-DNA entweder durch Agarosegelelektrophorese, Anionen-austauscher-HPLC (G. Ferreira et al., 1999, Pharm. Pharmacol. Commun., 5, S. 57-59) oder Kapillargelelektrophorese (Schmidt et al., 1999, Anal. Biochem., 274, 235-240) ein. Das Verhältnis monomeres:dimeres ccc kann durch Bildintensitätsanalyse nach Agarosegelelektrophorese (in Abwesenheit von interkalierenden Mitteln) und EtBr-Anfärbung unter Verwendung handelsüblicher Software wie Labworks 4.0, die auf einem UVP-Bioimaging-System läuft, gemessen werden.

[0043] Im Zusammenhang der vorliegenden Erfindung überzieht das feste Reservoirmedium die Kernelemente in einer Weise, so daß die resultierende Formulierung geeignet zur Verabreichung durch ballistische Übertragungsvorrichtungen ist. Entsprechend kann jedes Kernelement vollständig oder teilweise vom Reservoir bedeckt sein, oder eine Mehrzahl von Elementen kann innerhalb einer Matrix von festem Reservoir gefangen sein. In einem verwandten Verfahren zur Herstellung der Arzneiformen der vorliegenden Erfindung kann eine große Menge von Reservoir, das eine große Anzahl von Kernelementen umfaßt, zu kleineren Teilchen gemahlen werden, die zur Verabreichung durch ballistische Übertragungsvorrichtungen geeignet sind.

[0044] Andere geeignete Exzipienten, die in der Formulierung eingeschlossen werden können, schließen Puffer, Aminosäuren, Phasenübergangsinhibitoren ("Kristallgifte"), die zur Verhinderung von Paseränderung der Beschichtung während der Verarbeitung oder Lagerung hinzugegeben werden können, oder Inhibitoren zur Verhinderung nachteiliger chemischer Reaktionen während der Verarbeitung oder Lagerung ein, wie Inhibitoren der Maillard-Reaktion wie Aminosäuren.

[0045] Die festen Arzneiformen der vorliegenden Erfindung werden in der ballistischen Transfektion von Hautzellen unter Verwendung von Vorrichtungen verwendet, die die DNA-beschichteten Teilchen in einem Gasstrom mitreißen. Die Teilchen gelangen durch das Stratum corneum und gelangen in eine Zelle, in der die DNA freigesetzt und durch die Wirtszelle exprimiert wird. Alternativ betritt das Teilchen den extrazellulären Raum und setzt die DNA darin frei. Entsprechend sind die Kernelemente, die zur Verwendung in der vorliegenden Erfindung geeignet sind, diejenigen, die für diesen Zweck geeignet sind. Die Kernelemente verleihen der fertigen Arzneiform ausreichende Festigkeit und ausreichenden Impuls, um das Stratum corneum in jeder gegebenen ballistischen Übertragungsvorrichtung zu durchdringen. Es ist bevorzugt, daß die Kernelemente eine ausreichende Dichte haben, um den DNA-beschichteten Teilchen ausreichend Impuls zu verleihen; es wurde festgestellt, daß geeignete dichte Kerne Gold- oder Wolframrammikroperlen sind. Die Größe der Kernelemente ist bevorzugt diejenige, die ausreichend Masse verleiht, um den DNA-Teilchen den erforderlichen Impuls zu geben, während sie nicht zu groß ist, so daß die Hautzellen zu viel Schaden erleiden. Geeignete Kernelement-Teilchengrößen sind diejenigen, die bei Beschichtung Teilchen mit einem mittleren Durchmesser im Bereich von 0,5 bis 100 µm, bevorzugt 1 bis 50 µm, besonders bevorzugt 1 bis 10 µm und am meisten bevorzugt ca. 2 µm Durchmesser bilden.

[0046] Allgemein sind die Kernelemente annähernd kugelförmig, obwohl unregelmäßige Formen verwendet werden können. Am meisten bevorzugt sind die Kernelemente Gold- oder Wolframrammikroperlen.

[0047] Die vorliegende Erfindung beansprucht, daß ein amorpher Zucker, wenn er mit Metallteilchen und DNA vorhanden ist, der Formulierung Langzeitstabilität verleihen wird. Andere Exzipienten wie Tenside und Puffer können in der Formulierung eingeschlossen werden.

[0048] Beispiele für Verfahren zur Herstellung solcher Formulierungen, die amorphen Zucker enthalten, schließen ein:

1. Gefriertrocknung

[0049] Mische die Lösung, die Zucker enthält, DNA und Goldteilchen und fülle sie in Glasfläschchen. Diese Fläschchen werden teilweise mit einem Stopfen verschlossen und in einen Lyophilisator geladen. Die Regalbodentemperatur wird dann auf -45°C reduziert, was zum Einfrieren des Produkts in den Fläschchen führt. Nach Einfrieren aller Fläschchen wird der Kondensator auf unter -60°C abgekühlt. Die Primärtrocknung wird dann durch Erhöhen der Regalbodentemperatur auf ca. -30°C durchgeführt, während ein Vakuum von ca. 100

mT angelegt wird. Während der Primärtrocknung wird das Wasser aus den Eiskristallen, die gebildet werden, sublimiert. Nach Beendigung der Primärtrocknung wird die Regalbodentemperatur auf oberhalb Umgebungstemperatur erhöht, und maximales Vakuum wird angelegt. Die Sekundärtrocknung entfernt etwaiges fest gebundenes Wasser und trocknet das Pulver zum Erreichen von Langzeitstabilität.

2. Sprühtrocknung

[0050] Sprühtrocknung ist ein Dehydratisierungsverfahren, das Wärme aus einem heißen Gasstrom (gewöhnlich Luft) verwendet, um dispergierte Tröpfchen, die durch Atomisierung eines kontinuierlichen Flüssigkeitsstroms erzeugt werden, zu verdampfen. Resultierende Pulverprodukte trocknen innerhalb weniger Sekunden zu feinen Teilchen. Die Machbarkeit der Sprühtrocknung zur Erzeugung therapeutischer Proteinpulver wurde umfassend gezeigt (J. Broadhead, S.K.E. Rouan, I. Hau und C.T. Rhodes, 1994, J. Pharm. Pharmacol. 46: 458-467; M. Mumenthaler, C.C. Hsu und R. Pearlman 1994, Pharm. Res. 11: 12-20). In einer solchen Anwendung für unsere Formulierungsmischungen werden die formulierte DNA, Goldteilchen und Zuckerlösung einem Sprühtrockner mit einer typischen Einlaßtemperatur im Bereich von 50 bis 150°C zugeführt, typischerweise mit einer Fließgeschwindigkeit zwischen 0,1 und 10 ml/min. Das resultierende Pulver ist trocken und wird aus der Auffangkammer heraus aufgefangen.

3. Sprühgefriertrocknung

[0051] Sprühgefriertrocknung ist ein Verfahren, in dem die Lösung, die die DNA, Goldteilchen und Zucker enthält, auf Schalen gesprüht wird, die Trockeneis oder flüssigen Stickstoff enthalten. Dies führt zum unmittelbaren Einfrieren der Tröpfchen. Die Schalen werden dann in einen Lyophilisator geladen, und die Teilchen werden dann gemäß dem oben beschriebenen Verfahren gefriergetrocknet.

[0052] Unter Verwendung dieser Techniken kann jede feste DNA-Übertragungsdosis mit relativ hohen Mengen von DNA beladen werden. Die aus den obigen Techniken resultierenden Formulierungen können direkt oder nach Mahlen und Sieben für die mit Reservoirmedium beschichteten dichten Kernperlen verwendet werden.

[0053] Bevorzugt enthalten die Impfstoffformulierungen der vorliegenden Erfindung DNA, die ein Antigen oder eine antigene Zusammensetzung codiert, das/die eine Immunreaktion gegen ein humanes Pathogen hervorrufen kann, wobei das Antigen oder die antigene Zusammensetzung aus folgendem stammt: HIV-1 (wie tat, nef, gp120 oder gp160), humanen Herpesviren wie gD oder Derivaten davon oder unmittelbarem frühem Protein wie ICP27 aus HSV1 oder HSV2, Cytomegalovirus (speziell human) (wie gB oder Derivate davon), Rotavirus (einschließlich lebend-abgeschwächter Viren), Epstein-Barr-Virus (wie gp350 oder Derivate davon), Varicella Zoster-Virus wie gpl, II und IE63), oder aus einem Hepatitisvirus wie Hepatitis B-Virus (zum Beispiel Hepatitis B-Oberflächenantigen oder ein Derivat davon), Hepatitis A-Virus, Hepatitis C-Virus und Hepatitis E-Virus, oder aus anderen viralen Pathogenen wie Paramyxoviren, respiratorischem Synzytialvirus (wie F- und G-Proteine oder Derivate davon), Parainfluenzavirus, Masernvirus, Mumpsvirus, humanen Papillomaviren (z.B. HPV6, 11, 16, 18, ...), Flaviviren (z.B. Gelbfieberevirus, Dengue-Virus, zeckenbürtiges Enzephalitisvirus, Japanisches Enzephalitisvirus) oder Influenzavirus (ganzes lebendes oder inaktiviertes Virus, Spaltinfluenzavirus, gezüchtet in Eiern oder MDCK-Zellen oder Verozellen, oder ganze Grippevirosomen (wie von R. Gluck beschrieben, Vaccine, 1992, 10, 915-920) oder gereinigte oder rekombinante Proteine davon wie HA-, NP-, NA- oder M-Proteine oder Kombinationen daraus), oder abgeleitet aus bakteriellen Pathogenen wie *Neisseria* spp., einschließlich *N. gonorrhoea* und *N. meningitidis* (zum Beispiel Kapselpolysaccharide und Konjugate davon, Transferrin-bindende Proteine, Lactoferrin-bindende Proteine, PilC, Adhäsine); *S. pyogenes* (zum Beispiel M-Proteine oder Fragmente davon, C5A-Protease, Lipoteichonsäuren), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella* spp., einschließlich *M. catarrhalis*, auch bekannt als *Branhamella catarrhalis* (zum Beispiel Adhäsine und Invasine mit hohem und niedrigem Molekulargewicht); *Bordetella* spp., einschließlich *B. Pertussis* (zum Beispiel Pertactin, Pertussistoxin oder Derivate davon, filamentöses Hämagglutinin, Adenylatcyclase, Fimbrien), *B. parapertussis* und *B. bronchiseptica*; *Mycobacterium* spp., einschließlich *M. tuberculosis* (zum Beispiel ESAT6, Antigen 85A, -B oder -C), *M. bovis*, *M. leprae*, *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *M. smegmatis*; *Legionella* spp., einschließlich *L. pneumophila*; *Escherichia* spp., einschließlich enterotoxischem *E. coli* (zum Beispiel Kolonisierungsfaktoren, hitzelabiles Toxin oder Derivate davon, hitzestabiles Toxin oder Derivate davon), enterohämorrhagischem *E. coli*, enteropathogenem *E. coli* (zum Beispiel Shigatoxin-artiges Toxin oder Derivate davon); *Vibrio* spp., einschließlich *V. cholera* (zum Beispiel Cholera-toxin oder Derivate davon); *Shigella* spp., einschließlich *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexnerii*; *Yersinia* spp., einschließlich *Y. enterocolitica* (zum Beispiel ein Yop-Protein), *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*; *Campylobacter* spp., einschließlich *C. jejuni* (zum Beispiel Toxine, Adhäsine und Invasine) und *C. coli*; *Salmonella* spp., einschließlich *S. typhi*, *S. paratyphi*, *S.*

choleraesuis, *S. enteritidis*; *Listeria* spp., einschließlich *L. monocytogenes*; *Helicobacter* spp., einschließlich *H. pylori* (zum Beispiel Urease, Katalase, vakuolisierendes Toxin); *Pseudomonas* spp., einschließlich *P. aeruginosa*; *Staphylococcus* spp., einschließlich *S. aureus*, *S. epidermidis*; *Enterococcus* spp., einschließlich *E. faecalis*, *E. faecium*; *Clostridium* spp., einschließlich *C. tetani* (zum Beispiel Tetanustoxin und Derivate davon), *C. botulinum* (zum Beispiel Botulinumtoxin und Derivate davon), *C. difficile* (zum Beispiel Clostridiumtoxine A oder B und Derivate davon); *Bacillus* spp., einschließlich *B. anthracis* (zum Beispiel Botulinumtoxin und Derivate davon); *Corynebacterium* spp., einschließlich *C. diphtheriae* (zum Beispiel Diphtherietoxin und Derivate davon); *Borrelia* spp., einschließlich *B. burgdorferi* (zum Beispiel OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. garinii* (zum Beispiel OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. afzelii* (zum Beispiel OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. andersonii* (zum Beispiel OspA, OspC, DbpA, DbpB), *B. hermsii*; *Ehrlichia* spp., einschließlich *E. equi* und des Mittels der humanen granulozytischen Ehrlichiose; *Rickettsia* spp., einschließlich *R. rickettsii*; *Chlamydia* spp., einschließlich *C. trachomatis* (zum Beispiel MOMP, Heparin-bindende Proteine), *C. pneumoniae* (zum Beispiel MOMP, Heparin-bindende Proteine), *C. psittaci*; *Leptospira* spp., einschließlich *L. interrogans*; *Treponema* spp., einschließlich *T. pallidum* (zum Beispiel die selten Außenmembranproteine), *T. denticola*, *T. hyodysenteriae*; oder abgeleitet aus Parasiten wie *Plasmodium* spp., einschließlich *P. falciparum*; *Toxoplasma* spp., einschließlich *T. gondii* (zum Beispiel SAG2, SAG3, Tg34); *Entamoeba* spp., einschließlich *E. histolytica*; *Babesia* spp., einschließlich *B. microti*; *Trypanosoma* spp., einschließlich *T. cruzi*; *Giardia* spp., einschließlich *G. lamblia*; *Leshmania* spp., einschließlich *L. major*; *Pneumocystis* spp., einschließlich *P. carinii*; *Trichomonas* spp., einschließlich *T. vaginalis*; *Shistosoma* spp., einschließlich *S. mansoni*, oder abgeleitet aus Hefe wie *Candida* spp., einschließlich *C. albicans*; *Cryptococcus* spp., einschließlich *C. neoformans*. Andere bevorzugte bakterielle Impfstoffe umfassen Antigene, die abgeleitet sind aus *Haemophilus* spp., einschließlich *H. influenzae* Typ B (zum Beispiel PRP und Konjugate davon), nicht-typisierbarem *H. influenzae*, zum Beispiel OMP26, Adhäsinen mit hohem Molekulargewicht, P5, P6, Protein D und Lipoprotein D, und Fimbrin und aus Fimbrin abgeleitete Peptide (US 5,843,464).

[0054] In einer anderen Ausführungsform der vorliegenden Erfindung enthält die DNA-Arzneiform einen DNA-Impfstoff in Kombination mit einem Nicht-DNA-Antigen mit einem Protein- oder Polysaccharid-Antigen, das aus einem Pathogen stammt.

[0055] Einer der Vorteile der vorliegenden Erfindung ist die Fähigkeit der gleichzeitigen Formulierung des DNA-Mittels zusammen mit zusätzlichen aktiven Mitteln, eine Fähigkeit, die bei anderen festen DNA-Pharmazeutika beschränkt war. Zum Beispiel kann der DNA-Impfstoff ferner ein Mittel zur Steigerung der Aufnahme der DNA in die Zellen, einen Hilfsstoff oder ein anderes Immunstimulans zur Verbesserung und/oder Ausrichtung der Immunreaktion umfassen und kann auch ferner pharmazeutisch akzeptable Exzipienten umfassen.

[0056] Zum Beispiel kann das feste pharmazeutische Reservoirmedium bevorzugt ein DNA-Kondensationsmittel enthalten, zum Beispiel Spermidin oder PEI (Polyethylenimin). Andere Exzipienten, die in der Formulierung eingeschlossen werden können, schließen Puffer, Aminosäuren, Phasenveränderungsinhibitoren ("Kristallgifte"), die zur Verhinderung von Phasenveränderung der Beschichtung während der Verarbeitung oder Lagerung hinzugegeben werden können, oder Inhibitoren zur Verhinderung nachteiliger chemischer Reaktionen während der Verarbeitung oder Lagerung ein, wie Inhibitoren der Maillard-Reaktion wie Aminosäuren.

[0057] Ein bevorzugtes zusätzliches Mittel zu demjenigen, das im Reservoirmedium zusammen mit der DNA eingefangen ist, ist ein DNAase-Inhibitor. Ein Beispiel für einen DNAase-Inhibitor, der bevorzugt ist, ist Aurintricarbonsäure (ATA, J. Glasspool-Malone et al. (2000), *Molecular Therapy* 2: 140-146).

[0058] Impfstoffe der vorliegenden Erfindung können vorteilhaft auch einen immunologisch wirksamen Hilfsstoff in fester Lösung zusammen mit der DNA einschließen. Alternativ kann der Hilfsstoff mit separaten Mikroperlen an den DNA-überzogenen Mikroperlen assoziiert sein. Geeignete Hilfsstoffe für die Impfstoffe der vorliegenden Erfindung umfassen diejenigen Hilfsstoffe, die die Antikörperreaktionen gegen das Immunogen steigern können. Geeignete immunstimulatorische Mittel schließen ein, aber diese Liste ist keineswegs erschöpfend und schließt keine anderen Mittel aus: synthetische Imidazochinoline wie Imiquimod [S-26308, R-837], (Dockrell und Kinghorn, 2001, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, 751-755; Harrison et al., "Reduction of recurrent HSV disease using imiquimod alone oder combined with a glycoprotein vaccine", *Vaccine* 19: 1820-1826 (2001)); und Resiquimod [S-28463, R-8483 (Vasilakos et al., "Adjuvant activities of immune response modifier R-848: Comparison with CpG ODN", *Cellular Immunology* 204: 64-74 (2000)), Schiffische Basen von Carbonylen und Aminen, die konstitutiv auf Antigen-präsentierenden Zell- und T-Zell-Oberflächen exprimiert werden, wie Tucaresol (J. Rhodes et al., "Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs", *Nature* 377:71-75 (1995)), Cytokin-, Chemokin- und co-stimulatorische Moleküle als entweder Protein oder Peptid, dies würde proinflammatorische Cytokine einschließen wie GM-CSF, IL-1-alpha, IL-1-beta, TGF-alpha und TGF-beta, Th1-Induktoren wie Interferon-gamma, IL-2, IL-12, IL-15 und

IL-18, Th2-Induktoren wie IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 und IL-13 und andere Chemokine und kostimulatorische Gene wie MCP-1, MIP-1-alpha, MIP-1-beta, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 und CD40L, andere immunstimulatorische Zielliganden wie CTLA-4 und L-Selectin, Apoptose-stimulierende Proteine und Peptide wie Fas, (49), synthetische Lipid-basierte Hilfsstoffe wie Vaxfectin (Reges et al., "Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid DNA immunization", *Vaccine* 19: 3778-3786), Squalen, alpha-Tocopherol, Polysorbat 80, DOPC und Cholesterol, Endotoxin [LPS] (B. Beutler, "Endotoxin, Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity", *Current Opinion in Microbiology* 3: 23-30 (2000)); CpG Oligo- und Dinukleotide, Y. Sato et al., "Immunostimulatory DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization", *Science* 273 (5273):352-354 (1996); H. Hemmi et al., "A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA", *Nature* 408; 740-745 (2000), und andere potentielle Liganden, die Tollartige Rezeptoren zur Erzeugung von Th1-induzierenden Cytokinen auslösen, wie synthetische mycobakterielle Lipoproteine, mycobakterielles Protein p19, Peptidoglycan, Teichonsäure und Lipid A.

[0059] Bestimmte bevorzugte Hilfsstoffe zur Hervorrufung einer Reaktion vorherrschend vom Th1-Typ schließen zum Beispiel ein Lipid A-Derivat wie Monophosphoryllipid A oder bevorzugt 3-des-O-acyliertes Monophosphoryllipid A ein. MPL[®]-Hilfsstoffe sind von Corixa Corporation verfügbar (Seattle, WA; siehe zum Beispiel US-PS 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 und 4,912,094). CpG-haltige Oligonukleotide (in denen das CpG-Dinukleotid unmethyliert ist) induzieren auch eine vorherrschend Th1-Reaktion. Solche Oligonukleotide sind wohlbekannt und werden zum Beispiel beschrieben in WO 96/02555, WO 99/33488 und US-PSen 6,008,200 und 5,856,462. Immunstimulatorische DNA-Sequenzen werden auch zum Beispiel beschrieben von Sato et al., *Science* 273:352, 1996. Ein anderer bevorzugter Hilfsstoff umfaßt ein Saponin wie Quil A oder Derivate davon, einschließlich QS21 und QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escin; Digitonin; oder Gypsophila- oder Chenopodium quinoa-Saponine.

[0060] In diesem Aspekt der vorliegenden Erfindung ist das bevorzugte immunstimulatorische Mittel oder der bevorzugte Hilfsstoff Immiquimod oder andere verwandte Moleküle (wie Resiquimod), wie in WO 94/17043 beschrieben (dessen Inhalt hier durch Verweis eingeführt wird).

[0061] In einer Ausführungsform der Erfindung wird ein Polynukleotid als "nackte" DNA verabreicht/übertragen, zum Beispiel wie beschrieben in Ulmer et al., *Science* 259:1745-1749, 1993 und zusammengefaßt von Cohen, *Science* 259:1691-1692, 1993. Die Aufnahme von nackter DNA kann durch Auftragen der DNA auf kleine Mikroperlen erhöht werden, wie zum Beispiel Gold, oder auf biologisch abbaubare Perlen, die effizient in die Zellen transportiert werden; oder durch Verwendung anderer wohlbekannter, die Transfektion erleichternder Mittel wie Calciumphosphat oder DEAE-Dextran.

[0062] Die Menge an exprimierbarer DNA in jeder Impfstoffverabreichung wird als eine Menge ausgewählt, die eine immunprotektive Reaktion ohne signifikante nachteilige Nebenwirkungen in typischen Impfungen induziert. Eine solche Menge wird in Abhängigkeit davon variieren, welches spezifische DNA-Konstrukt eingesetzt wird, jedoch wird erwartet, daß jede Dosis allgemein 1-1000 µg DNA, bevorzugt 1-500 µg, besonders bevorzugt 1-100 µg umfassen wird, worunter 1 bis 50 µg der am meisten bevorzugte Bereich ist. Eine optimale Menge für einen besonderen Impfstoff kann durch Standardstudien sichergestellt werden, die die Beobachtung geeigneter Immunreaktionen in Probanden beinhalteten. Nach einer Erstimpfung können Probanden eine oder mehrere Auffrischungsimpfungen in angemessenem Abstand erhalten.

[0063] Ebenfalls bereitgestellt durch die vorliegende Erfindung werden ballistische Übertragungsvorrichtungen, die mit den DNA-Arzneiformen der vorliegenden Erfindung beladen sind.

[0064] Die Formulierungen der vorliegenden Erfindung können für sowohl prophylaktische als auch therapeutische Zwecke verwendet werden. Entsprechend sieht die vorliegende Erfindung ein Verfahren zur Behandlung eines Säugers vor, der für eine infektiöse Krankheit oder Krebs oder Allergie oder Autoimmunkrankheit anfällig ist oder daran leidet. In einem weiteren Aspekt der vorliegenden Erfindung wird ein Impfstoff wie hier beschrieben zur Verwendung in der Medizin bereitgestellt. Die Impfstoffherstellung wird allgemein beschrieben in *New Trends and Developments in Vaccines*, herausgegeben von Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, USA 1978.

[0065] Die vorliegende Erfindung wird ohne Beschränkung durch die folgenden Beispiele exemplarisch dargestellt.

Beispiel 1, Demonstration der Beschichtung von Mikroperlen mit einem Reservoirmedium, das Plasmid-DNA umfaßt

Plasmidherstellung und Formulierungen

[0066] Die in dieser Untersuchung verwendeten Plasmide sind alle in [Fig. 1](#) gezeigt. pEGFP-C1 ist ein GFP-Expressionsvektor (Clontech, Palo Alto, CA, USA). pGL3CMV ist ein auf pGL3 Basic basierter Luciferaseexpressionsvektor (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA), worin der CMV unmittelbare frühe Promotor die Luciferaseexpression antreibt. pVAC1.ova ist ein Hühnerovalbumin-Expressionsplasmid, das durch Ligieren von PCR-amplifizierter cDNA, die Hühnerovalbumin codiert, aus pUGOVA in den Expressionsvektor pVAC1 konstruiert wird. pVAC1 ist eine Modifizierung des Säuger-Expressionsvektors pCI (Promega), worin der multiple Klonierungsort von EcoRI bis BstZI durch die EMCV IRES-Sequenz ersetzt wurde, flankiert 5' von besonderen NheI-, RsrII- und XhoI- und 3' von besonderen PacI-, AscI- und NotI-Restriktionsenzymorten, amplifiziert aus pGL3Basic (Promega). Supercoiled-Plasmid-DNA (arm an Endotoxin) wurde im großen Maßstab gereinigt, ca. 100 mg Ausbeute, auf eine hohe Reinheit unter Verwendung einer Kombination aus alkalischer SDS-Lyse, Ultrafiltration und Anionenaustauscher-Säulenchromatographie. Plasmide wurden in TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA), pH 8,0 mit 1 µg/µl resuspendiert und zu >95 % supercoiled nach Analyse durch Agarosegelelektrophorese bestimmt.

[0067] Plasmide wurden in einer Vielzahl von Lösungen zur Beschichtung von Nadeln durch ein standardmäßiges Ethanol-Präzipitationsverfahren im großen Maßstab formuliert. Die ausgefällte DNA wurde direkt in den wäßrigen Formulierungslösungen mit Konzentrationen von 0,5 bis 12 µg/µl resuspendiert (siehe Kapitel 1, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook et al., 2. Auflage, 1989, CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA).

1.2 Gefriertrocknung

[0068] Mische die Zucker enthaltende Lösung (1-40 % Saccharose oder Trehalose), DNA, Plasmid und Goldteilchen und fülle sie in Glasfläschchen. Diese Fläschchen werden teilweise mit einem Stopfen verschlossen und in einen Lyophilisator geladen. Die Regalbodentemperatur wird dann auf -45°C reduziert, was zum Einfrieren des Produkts in den Fläschchen führt. Nach Gefrieren aller Fläschchen wird der Kondensator auf unter -60°C abgekühlt. Die Primärtrocknung wird dann durch Erhöhen der Regalbodentemperatur auf ca. -30°C durchgeführt, während ein Vakuum von ca. 100 mT angelegt wird. Während der Primärtrocknung wird das Wasser aus den Eiskristallen, die sich bilden, sublimiert. Nach Beendigung der Primärtrocknung wird die Regalbodentemperatur auf über Umgebungstemperatur erhöht und maximales Vakuum angelegt. Die Sekundärtrocknung entfernt etwaiges fest gebundenes Wasser und trocknet das Pulver zum Erreichen von Langzeitstabilität.

1.3 Sprühtrocknung

[0069] Sprühtrocknung ist ein Dehydratisierungsverfahren, das Wärme aus einem heißen Gasstrom (gewöhnlich Luft) verwendet, um dispergierte Tröpfchen, die durch Atomisierung eines kontinuierlichen Flüssigkeitsstroms erzeugt werden, zu verdampfen. Resultierende Pulverprodukte trocknen innerhalb weniger Sekunden zu feinen Teilchen. Die Machbarkeit der Sprühtrocknung zur Erzeugung therapeutischer Proteinpulver wurde umfassend gezeigt (J. Broadhead, S.K.E. Rouan, I. Hau und C.T. Rhodes, 1994, J. Pharm. Pharmacol. 46: 458-467; M. Mumenthaler, C.C. Hsu und R. Pearlman 1994, Pharm. Res. 11: 12-20). In einer solchen Anwendung für unsere Formulierungsmischungen werden die formulierte DNA, Goldteilchen und Zuckerlösung einem Sprühtrockner mit einer typischen Einlaßtemperatur im Bereich von 50 bis 150°C zugeführt, typischerweise mit einer Fließgeschwindigkeit zwischen 0,1 und 10 ml/min. Das resultierende Pulver ist trocken und wird aus der Auffangkammer heraus aufgefangen.

1. Sprühgefriertrocknung

[0070] Sprühgefriertrocknung ist ein Verfahren, in dem die Lösung, die die DNA, Goldteilchen und Zucker enthält, auf Schalen gesprüht wird, die Trockeneis oder flüssigen Stickstoff enthalten. Dies führt zum unmittelbaren Einfrieren der Tröpfchen. Die Schalen werden dann in einen Lyophilisator geladen, und die Teilchen werden dann gemäß dem oben beschriebenen Verfahren gefriergetrocknet.

[0071] Die aus den obigen Techniken resultierenden Formulierungen können direkt oder nach Mahlen in herkömmlichen ballistischen Übertragungsvorrichtungen verwendet werden, und die Expression in Zielzellen

kann durch Beobachtung der Luciferaseexpression verfolgt werden. Die Proben sind ebenfalls stabil gemäß Messung durch Bewahrung der Supercoiled-Struktur.

Beispiel 2, Stabilität von Plasmid-DNA in unterschiedlichen Zuckerformulierungen nach Auftragung, Lyophilisierung und Lagerung auf Nadeln bei 37°C.

[0072] Ein Vergleich zwischen der Plasmid-DNA-Stabilität einer Reihe unterschiedlicher DNA-Formulierungen wurden durchgeführt, worin entweder die Saccharosemenge oder der Zuckertyp, der in der Formulierung verwendet wurde, variiert wurde. Alle anderen, zuvor als optimal für die DNA-Stabilität und -Freisetzung festgestellten Exzipienten waren in allen Formulierungen vorhanden (d.h. 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 10 mM Methionin und 2,9 % Ethanol). Die Formulierungen wurden auf ihre Fähigkeit zur Stabilisierung von Supercoiled-Plasmid-DNA nach Auftragen und Lyophilisierung auf Nadeln bei Lagerung für bis zu 1 Monat bei 37°C verglichen (beschleunigte DNA-Stabilitätsuntersuchung). Plasmid-DNA (pVAC1.OVA) wurde dann eluiert und in der üblichen Weise gewonnen und der Agarosegelelektrophorese (100 V, 100 mA für 2 Stunden) in Abwesenheit von interkalierenden Mitteln unterworfen (J. Sambrook et al., s.o.). Die Integrität der eluierten Plasmid-DNA wurde dann nach Anfärben mit Ethidiumbromid und Visualisierung unter UV-Licht überwacht. Der Prozentanteil von monomeren und dimeren Supercoiled-Plasmidformen und ebenfalls etwaigen linearen und offenen ringförmigen Formen aus diesen Proben wurde als Bildintensität unter Verwendung der Labworks 4.0 Bildanalysesoftware auf dem UVP Bioimaging System gemessen.

[0073] Die Daten sind in **Fig. 2** als graphische Auftragung des Prozentanteils von Supercoiled-Plasmid (%ccc), sowohl monomeren (%cccmon) als auch dimeren (%cccdim) Plasmidformen, nach Auftragung und Lyophilisierung auf Impfnadeln und Lagerung bei 37°C dargestellt. Die verwendeten Plasmidformulierungen enthalten variierende Menge von Zuckern: **Fig. 2A**: 5 % Saccharose, **Fig. 2B**: 10 % Saccharose, **Fig. 2C**: 17,5 % Saccharose, **Fig. 2D**: 40 % Saccharose, **Fig. 2E**: 40 % Trehalose, **Fig. 2F**: 40 % Glucose.

[0074] Die Daten legen nahe, daß alle zuckerhaltigen Formulierungen einen hohen Grad an Plasmidstabilität bewahren, selbst nach Lagerung bei 37°C für bis zu einem Monat, mehr als 80 % und bis zu 98 % des Plasmids verbleiben in einer Supercoiled-Form. Für Formulierungen, die Zuckerspiegel von 40 % (G/V) enthalten, bleibt das Gleichgewicht zwischen den monomeren und dimeren Plasmidformen relativ konstant, wobei die bevorzugte monomere Form in Zuckerformulierungen vorherrscht, die von Trehalose zu Saccharose zu Glucose variieren (**Fig. 2D**, **Fig. 2E** und **Fig. 2F**). Für Formulierungen, die geringere Konzentrationen an Saccharose enthalten, neigen die dimeren Formen gegenüber dem Monomer vorzuherrschen, speziell bei ausgedehnter Lagerung bei 37°C (**Fig. 2A**, **Fig. 2B** und **Fig. 2C**). Allgemein sind die Daten in Übereinstimmung mit der höheren Zuckermenge, die in der Formulierung vorhanden ist, was zu größerer Stabilität von Plasmid-DNA führt.

Beispiel 3, Demonstration der amorphen Glasbildung nach Lyophilisierung von Plasmid-DNA in Saccharoseformulierungen, die Exzipienten enthalten.

Analyse von lyophilisierten Plasmid-DNA-Formulierungen durch Differentialrasterkalorimetrie (DSC)

[0075] Proben von lyophilisierten DNA/Saccharose-Formulierungen wurden hergestellt, die Plasmid-DNA (pVAC1.OVA) (10 mg/ml) in 40%iger Saccharose enthielten, und auch lyophilisierte Proben wurden hergestellt, die zusätzlich 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 0,1 mM EDTA, 10 mM Methionin und 2,9 % Ethanol enthielten. Die Proben wurden aufgespalten und entweder 1-stündigen oder 24-stündigen Lyophilisierungszyklen unterworfen. Die Proben wurden dann durch Differentialrasterkalorimetrie (DSC) analysiert, um die Form des festen Zustands zu bestimmen. Dies wurde auf einem Gerät TA Instruments DSC2920 über einen Temperaturbereich von 25 bis 300°C unter Verwendung von Stickstoff als Spülgas mit einer Fließgeschwindigkeit von 20 ml/min durchgeführt. Der Typ des Probentiegels war eine Lochblende aus Aluminium, und das Probengewicht wurde am Tag der Analyse auf einer Mettler M3-Waage bestimmt.

[0076] Die Daten sind in **Fig. 3** gezeigt. Alle Proben enthalten Plasmid-DNA (10 mg/ml) in 40%iger Saccharose. **Fig. 3A** und B: Formulierungen enthalten ebenfalls: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 10 mM Methionin und 2,9 % Ethanol; **Fig. 3A** und C stellen einen 24-stündigen Lyophilisierungszyklus dar; **Fig. 3B** und D stellen einen 1-stündigen Lyophilisierungszyklus dar. Die Daten legen nahe, daß alle Proben amorphe Saccharose enthalten, wobei Saccharose-Glasübergangstemperaturen bei ca. 78°C (**Fig. 3A**), 85°C (**Fig. 3B**), 74°C (**Fig. 3C**) und 63°C (**Fig. 3D**) beobachtet werden, die gut mit veröffentlichten Werten in der Literatur übereinstimmen. Die Daten legen nahe, daß sowohl kurze als auch lange Lyophilisierungszyklen ein amorphes Saccharoseglas erzeugen können. Amorphes Glas kann sich in Gegenwart von hohen Plasmid-DNA-Konzentrationen und auch in Gegenwart aller beschriebenen Exzipienten bilden. Da es jedoch unklar war, ob etwas

kristallines Material in den Proben vorhanden war oder nicht oder sich während der DSC-Analyse selbst gebildet hatte, wurden die Proben ferner durch die Technik der Mikroskopie mit polarisiertem Licht analysiert, um die amorphe/kristalline Natur der Proben zu bestimmen.

Analyse von lyophilisierten Plasmid-DNA-Formulierungen durch Mikroskopie mit polarisiertem Licht

[0077] Die für die DSC-Analyse hergestellten, oben beschriebenen lyophilisierten Plasmid-DNA/Saccharose-Proben (\pm Exzipienten) wurden der Analyse durch Mikroskopie mit polarisiertem Licht unterworfen. Kontrollproben wurden hergestellt aus nur 40 % Saccharose, lyophilisiert für 1-stündige und 24-stündige Zyklen, und kristalline Proben aus Saccharose und den festen Hauptexzipienten: Methionin, Tris-HCl und EDTA wurden ebenfalls analysiert. Dies erfolgte zum Vergleich und zur Feststellung des Erscheinungsbilds von etwaigem kristallinem Material, das in den Formulierungen vorhanden war. Die Analyse wurde an einem Mikroskop mit polarisiertem Licht Zeiss STD16-444111 durchgeführt, wobei die Proben in Immersionsöl aufgestellt und davon bedeckt wurden.

[0078] Die Daten sind in **Fig. 4** gezeigt, worin alle Formulierungen Plasmid-DNA (10 mg/ml) in 40%iger Saccharose enthalten. **Fig. 4A**: Formulierungen enthalten ebenfalls: 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 10 mM Methionin und 2,9 % Ethanol, **Fig. 4C**: enthält nur 40 % Saccharose, und **Fig. 4D**: zeigt Kristalle des festen Hauptexzipienten. 1AM, 2AM und 3AM stellen einen 24-stündigen Lyophilisierungszyklus dar, wohingegen 1ST, 2ST und 3ST einen 1-stündigen Lyophilisierungszyklus darstellen.

[0079] Aus **Fig. 4C** ist ersichtlich, daß an 40 % Saccharose allein durchgeführte sowohl 1-stündige als auch 24-stündige Lyophilisierungszyklen nur ein amorphes Glas wie erwartet erzeugen. Nach **Fig. 4B** ermöglicht die Zugabe von Plasmid-DNA (10 mg/ml) zur 40-%igen Saccharose-Formulierung, obwohl sie weitgehend die Bildung eines amorphen Glases erlaubt, die teilweise Bildung von etwas kristalliner Saccharose (Proben 2AM und 2ST bestehend aus amorphem Material mit etwas Hinweis auf einige Kristallteilchen, die Saccharose sein könnten). Jedoch reduziert nach **Fig. 4A** die Zugabe der Exzipienten zur DNA/Saccharose-Formulierung die Menge der kristallinen Teilchenformulierung in den für 24 Stunden lyophilisierten Proben (1AM, die Masse der Probe besteht aus Blättern aus amorphem Material, es gibt weniger kristalline Teilchen), und für kurze Lyophilisierungszyklen von 1 Stunde gibt es keinen Hinweis auf die Bildung von kristallinen Teilchen, nur ein amorphes Glas. Dies legt nahe, daß die Zugabe der beschriebenen Exzipienten zu Plasmid-DNA in Saccharose nicht nur bei der Verbesserung der DNA-Freisetzung und -Stabilität vor Abbau hilft, sondern auch bei der Konservierung des amorphen Glaszustands bei kurzen Zyklen der Lyophilisierung hilft.

Beispiel 4, Demonstration der amorphen Glasbildung nach Lyophilisierung von Plasmid-DNA in unterschiedlichen Zucker/Polyol-Formulierungen, die Exzipienten enthalten.

[0080] Zur Bestimmung, ob die Natur des in der Plasmid-DNA-Formulierung mit Exzipienten vorhandenen Polyols/Zuckers wie oben beschrieben die Fähigkeit solcher Formulierungen zur Erzeugung eines amorphen Glases bei Lyophilisierung beeinflusst, wurde das Polyol variiert. Eine Reihe ähnlicher Formulierungen, die sich nur im vorhandenen Polyol unterschieden, wurde erzeugt, lyophilisiert und durch Mikroskopie mit polarisiertem Licht analysiert. Dies wurde in einer ähnlichen Weise zu derjenigen in Beispiel 3 durchgeführt, außer daß in diesem Fall ein Mikroskop mit polarisiertem Licht Olympus BX51 verwendet wurde.

[0081] Die Daten sind in **Fig. 5** gezeigt, worin alle Formulierungen lyophilisierte Plasmid-DNA (pVAC1.OVA) (10 mg/ml) und 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 10 mM Methionin und 2,9 % Ethanol enthalten. **Fig. 5A**, Probe 1: 40 % G/V Ficoll, Probe 2: 20 % G/V Dextran, Probe 3: 40 % G/V Saccharose, Probe 4: 20 % G/V Maltotriose. **Fig. 5**, Probe 5: 20 % G/V Lactose, Probe 6: 30 % G/V Maltose, Probe 7: 40 % G/V Glucose, Probe 8: 40 % G/V Trehalose. Man bemerke, daß alle beschriebenen Proben und alle analysierten Formulierungen ein amorphes Glas mit wenig oder keinem Hinweis auf vorhandenes kristallines Material bildeten. Man bemerke, daß für die als Probe 2 beschriebene Formulierung, die 20 % G/V Dextran enthielt, anschließend gezeigt wurde, daß die Plasmid-DNA aus der Lösung ausfiel, durch agarosegelelektrophoretische Analyse (Daten nicht gezeigt), und deshalb keine bevorzugte Formulierung sein würde. Diese Daten zeigen, daß Plasmid-DNA plus die beschriebenen Exzipienten bei Lyophilisierung in einem amorphen Glaszustand durch eine Vielzahl von in der Literatur beschriebene Polyole/Zucker bewahrt werden kann (R. Hatley und J. Blair (1999), Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 7: 11-19).

Beispiel 5, Lyophilisierung von Zucker/Gold/DNA-Formulierungen

[0082] Das Ziel dieser Untersuchung war die Lyophilisierung von drei Zuckerbasierten DNA-Formulierungen,

die Goldteilchen enthielten. Die Formulierungen wurden wie nachfolgend gezeigt gebildet:

- Formulierung 1, hergestellt aus 40 % Saccharose, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM L-Methionin und 2,9 % Ethanol.
- Formulierung 2 enthielt 10 % Saccharose, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM L-Methionin und 2,9 % Ethanol.
- Formulierung 3 wurde hergestellt aus 40 % Trehalose, 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 10 mM L-Methionin und 2,9 % Ethanol.

[0083] Supercoiled Hepatitis B-Plasmid wurde in jeder der drei Formulierungen mit einer Konzentration von 1 mg/ml formuliert. Goldteilchen wurden zu jeder Formulierung in einer Konzentration von 0,5 g auf 10 ml Formulierung hinzugegeben. Die Formulierungen wurden durch Eintropfen jeder Formulierung in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die resultierenden gefrorenen Perlen wurden in 3 ml-Gefriertrocknungsfläschchen überführt. Die Fläschchen wurden in einem Gefriertrockner DW8 Heto Holten unter Verwendung des nachfolgend gezeigten Zyklus gefriergetrocknet:

Zyklusstufe	Temperatur (°C)/Vakuum (hPa)	Zeit (h)
Einfrierstufe	bis -40°C	so schnell wie möglich
Halten	-40°C	3
Primärtrocknung	-38°C/Vakuum (0,107 hPa)	8
Sekundärtrocknung (Anstieg)	-38°C bis 5°C/Vakuum (so niedrig wie möglich)	11
Sekundärtrocknung (Anstieg)	5°C bis 10°C/Vakuum (so niedrig wie möglich)	2
Sekundärtrocknung (Halten)	10°C/Vakuum (so niedrig wie möglich)	2

[0084] Die gefriergetrockneten Proben wurden unter Vakuum verschlossen. Das Vakuum wurde abgelassen und die Fläschchen aus dem Gefriertrockner entfernt. Eine beschleunigte Stabilitätsuntersuchung (bei 25°C) wurde unter Verwendung der gefriergetrockneten DNA-Formulierungen aufgestellt. Die Stabilitätsuntersuchung wurde in wöchentlichen Intervallen unter Verwendung von Ethidiumbromid-angefärbter Agarosegelelektrophorese überwacht.

Agarosegelelektrophorese

[0085] Eine 0,6%ige Agarosegelelektrophorese wurde an Stabilitätsproben zur Bestimmung einer Veränderung der DNA-Konformation während der Untersuchung durchgeführt. Jede lyophilisierte Probe wurde in destilliertem Wasser rekonstituiert und in eine jeweilige Vertiefung des Agarosegels unter Verwendung der folgenden Kombination aus Probe, Beladungspuffer und destilliertem Wasser gegeben. 2 µl Probe + 16 µl destilliertes Wasser + 2 µl Beladungspuffer.

[0086] 20 µl jeder Probe wurden in die jeweilige Vertiefung des Gels gegeben. Die Proben wurden über Nacht mit 20 V elektrophoretisch behandelt. Das elektrophoretisch behandelte Gel wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht betrachtet. Die Stabilitätsproben wurden nach Lagerung bei 25°C für 1 und 3 Wochen getestet.

Ergebnisse

[0087] Die Photographien der Gele, die die Proben für eine und drei Wochen enthalten, sind in [Fig. 6](#) und [Fig. 7](#) gezeigt. [Fig. 6](#) zeigt das DNA-Profil von Proben, die bei 25°C für 1 Woche gelagert wurden (Bahn 1 auf der linken Seite): Bahn 1-1 kb-Leiter, Bahn 2: gefriergetrocknete Probe (Formulierung 1) bei 25°C nach einer Woche Lagerung; Bahn 3 – gefriergetrocknete Probe (Formulierung 1) bei 5°C nach einer Woche Lagerung – Kontrolle; Bahn 4 – gefriergetrocknete Probe (Formulierung 2) bei 25°C nach einer Woche Lagerung; Bahn 5 – gefriergetrocknete Probe (Formulierung 2) bei 5°C nach einer Woche Lagerung; Bahn 6 – gefriergetrocknete

Probe (Formulierung 3) bei 25°C nach einer Woche Lagerung; Bahn 7 – gefriergetrocknete Probe (Formulierung 3) bei 5°C nach einer Woche Lagerung; Bahn 8 – flüssige Formulierung 1 vor der Gefriertrocknung bei 5°C; Bahn 9 – flüssige Formulierung 2 vor der Gefriertrocknung bei 5°C; Bahn 10 – flüssige Formulierung 3 vor der Gefriertrocknung bei 5°C; Bahn 11 – urformuliertes Plasmid, GW700561X (Charge A01B30); Bahn 12 – gefriergetrocknete Negativkontrolle der Formulierung 1, die aus Formulierung 1 Verdünnungsmittel + Goldperlen ohne DNA-Plasmid besteht.

[0088] Die Ergebnisse zeigten:

- Für keine der drei gefriergetrockneten Formulierungen (bei 25°C) bei Vergleich mit den Kontrollen bei 5°C wurde eine signifikante Konformationsveränderung detektiert. Der Großteil der DNA wurde als supercoiled festgestellt, obwohl relativ kleine Mengen von offenen ringförmigen und linearen Topoisomeren ebenfalls detektiert wurden.
- Die flüssigen Formulierungen vor der Gefriertrocknung erzeugten ähnliche Bandenprofile zu den Proben nach der Gefriertrocknung. Die in den Proben vor der Gefriertrocknung detektierte höhere Fluoreszenzstärke beruht wahrscheinlich auf der höheren Konzentration an DNA darin.
- Kein signifikanter Unterschied des DNA-Profiles wurde zwischen der Formulierung und nichtformuliertem Plasmid (Bahn 11) detektiert.
- Wie erwartet wurden keine Banden in Bahn 12 (Negativkontrolle) beobachtet.

[0089] [Fig. 7](#) zeigt das DNA-Profil der bei 25°C für 3 Wochen gelagerten Proben, wobei Bahn 1 auf der linken Seite ist: Bahn – 1 kb-Leiter; Bahn 2 – gefriergetrocknete Probe (Formulierung 1) bei 25°C nach drei Wochen Lagerung; Bahn 3 – gefriergetrocknete Probe (Formulierung 1) bei 5°C nach drei Wochen Lagerung – Kontrolle; Bahn 4 – gefriergetrocknete Probe (Formulierung 2) bei 25°C nach drei Wochen Lagerung; Bahn 5 – gefriergetrocknete Probe (Formulierung 2) bei 5°C nach drei Wochen Lagerung; Bahn 6 – gefriergetrocknete Probe (Formulierung 3) bei 25°C nach drei Wochen Lagerung; Bahn 7 – gefriergetrocknete Probe (Formulierung 3) bei 5°C nach 3 Wochen Lagerung; Bahn 8 – flüssige Formulierung 1 vor der Gefriertrocknung bei 5°C; Bahn 9 – flüssige Formulierung 2 vor der Gefriertrocknung bei 5°C; Bahn 10 – flüssige Formulierung 3 vor der Gefriertrocknung bei 5°C; Bahn 11 – unformuliertes Plasmid; Bahn 12 – gefriergetrocknete Negativkontrolle der Formulierung 1, die aus Formulierung 1 Verdünnungsmittel + Goldperlen ohne DNA-Plasmid besteht.

[0090] Die Ergebnisse zeigten:

- Für keine der drei gefriergetrockneten Formulierungen (bei 25°C) bei Vergleich mit den Kontrollen bei 5°C wurde eine signifikante Konformationsveränderung detektiert. Der Großteil der DNA wurde als supercoiled festgestellt, obwohl relativ kleine Mengen von offenen ringförmigen und linearen Isoformen ebenso detektiert wurden.
- Die flüssigen Formulierungen vor der Gefriertrocknung erzeugten ähnliche DNA-Profile wie die Proben nach der Gefriertrocknung. Die in den Proben vor der Gefriertrocknung detektierte höhere Fluoreszenzstärke beruht wahrscheinlich auf der höheren Konzentration an DNA darin.

Schlußfolgerungen

[0091] In dieser Untersuchung haben wir gezeigt, daß es möglich ist, Zucker/Gold-basierte DNA-Formulierungen ohne eine signifikante Veränderung der DNA-Konformation gefrierzutrocknen. Zusätzlich haben wir gezeigt, daß die resultierenden lyophilisierten Perlen stabil bei 25°C für einen Zeitraum von 3 Wochen waren.

Patentansprüche

1. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform mit einem dichten Kernelement, das mit einem festen Reservoirmedium überzogen ist, das das DNA-Pharmazeutikum enthält.

2. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 1, die ferner ein Stabilisierungsmittel umfaßt, das die abbauenden Wirkungen von freien Radikalen inhibiert.

3. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 2, worin das Stabilisierungsmittel eines oder beide aus einem Metallionen-Komplexbildner und einem freien Radikalfänger ist.

4. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 3, worin der Metallionen-Komplexbildner aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Inosithexaphosphat, Tripolyphosphat, Bernsteinsäure und Äpfelsäure, Ethylen-diamintetraessigsäure (EDTA), Tris(hydroxymethyl)aminomethan (IRIS), Desferal, Diethylentriaminpentaessigsäure (DTPA) und Ethylendiamindihydroxyphenyllessigsäure (EDDHA) besteht.

5. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 3, worin der nicht-reduzierende freie Radikalfänger aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus Ethanol, Methionin oder Glutathion besteht.
6. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 3, worin das stabilisierungsmittel, das die abbauenden Wirkungen von freien Radikalen inhibiert, (a) phosphatgepufferte EthanolLösung in Kombination mit Methionin oder EDTA oder (b) Tris-gepuffertes EDTA in Kombination mit Methionin oder Ethanol (oder Kombinationen aus Methionin und Ethanol) ist.
7. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß einem der Ansprüche 1 bis 6, worin das feste Reservoirmedium ein amorphes Polyol ist.
8. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 7, worin das Polyol ein stabilisierendes Polyol ist.
9. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß einem der Ansprüche 1 bis 8, worin das feste biologisch abbaubare Reservoirmedium ein Zucker ist.
10. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 9, worin der Zucker aus Lactose, Glucose, Saccharose, Raffinose oder Trehalose ausgewählt ist.
11. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß einem der Ansprüche 1 bis 10, worin das feste Reservoirmedium in Form eines Glases ist.
12. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 11, worin das feste Reservoirmedium in Form eines Zuckerglases ist.
13. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß einem der Ansprüche 1 bis 12, worin die DNA Supercoiled-Plasmid-DNA ist.
14. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 13, worin die Supercoiled-Plasmid-DNA so stabilisiert ist, daß nach Lagerung bei 37°C für 4 Wochen mehr als 50 % der DNA in ihrer Supercoiled-Form verbleiben.
15. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 13, worin die DNA so stabilisiert ist, daß bei Freisetzung das Verhältnis von monomerer zu dimerer Supercoiled-Form im Bereich von 0,8:1,2 ist.
16. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß einem der Ansprüche 1 bis 15, worin das Pharmazeutikum ein Impfstoff ist.
17. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß einem der Ansprüche 1 bis 16, worin das feste Reservoirmedium ferner einen Hilfsstoff für einen Impfstoff, ein die Transfektion erleichterndes Mittel, DNAase-Inhibitor oder ein Kristallgift umfaßt.
18. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 17, worin der Hilfsstoff aus der Gruppe ausgewählt ist, die aus CpG, synthetischen Imidazochinolinen, Tucerasol, Cytokinen, MPL, QS21, QS7 und Öl-in-Wasser-Emulsionen besteht.
19. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 1, worin die dichten Kernelemente Mikroperlen mit einem mittleren Teilchendurchmesser von 0,5 bis 10 µm sind.
20. DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 19, worin das dichte Kernelement eine Gold- oder Wolfram-Mikroperle ist.
21. Verfahren zur Herstellung einer DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 1, umfassend das Herstellen einer Lösung aus DNA-Pharmazeutikum, Reservoirmedium und Stabilisierungsmittel, das die abbauenden Wirkungen von freien Radikalen inhibiert, in einem Lösungsmittel, gefolgt von Beschichten des wenigstens einen dichten Kernelements mit der Lösung und Entfernen des Lösungsmittels zur Bildung eines festen Reservoirmediums, das das Pharmazeutikum und Mittel, das die abbauenden Wirkungen von freien Radikalen inhibiert, enthält.
22. Verfahren zur Herstellung einer DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 21, worin das Re-

servoirmmedium ein Zucker ist.

23. Verfahren zur Herstellung einer DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 22, worin die Konzentration des Zuckers vor der Trocknung auf dem Trägerelement im Bereich von 20-40 % G/V ist.

24. Verfahren zur Herstellung einer DNA-Pharmazeutikum-Arzneiform gemäß Anspruch 23, worin das Lösungsmittel vor dem Verfahren entmetallisiert wird.

Es folgen 16 Blatt Zeichnungen

FIG 1, pVAC1.OVA

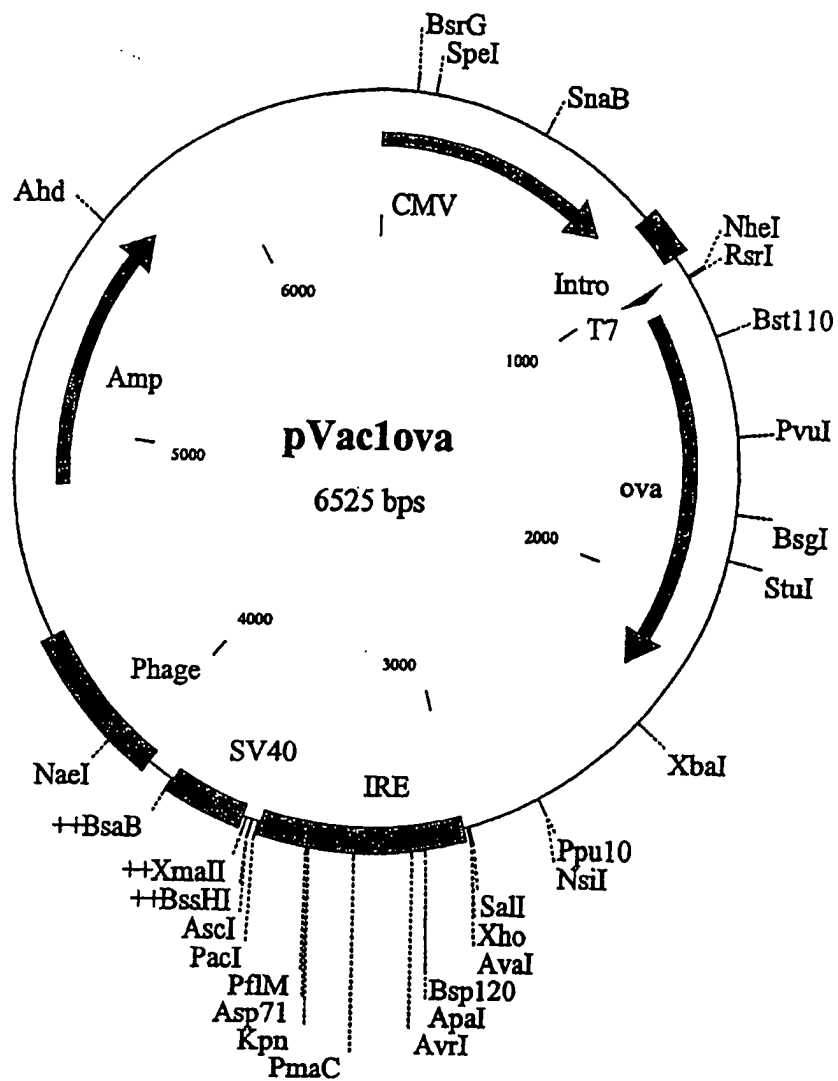


FIG 2A

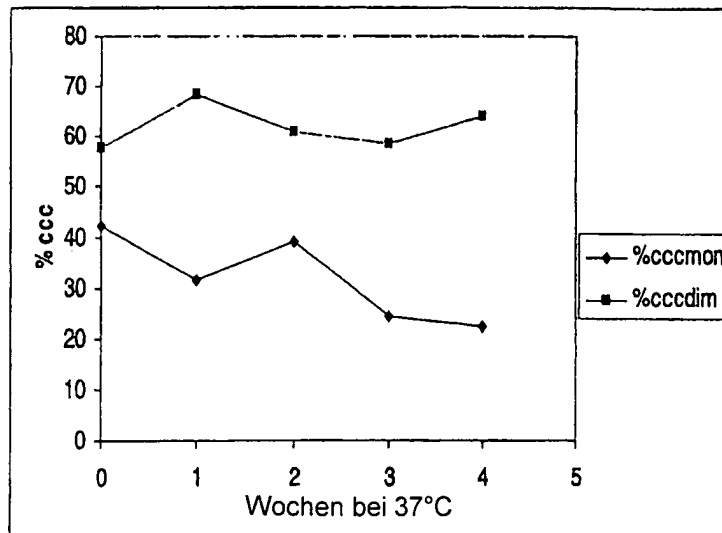


FIG 2B

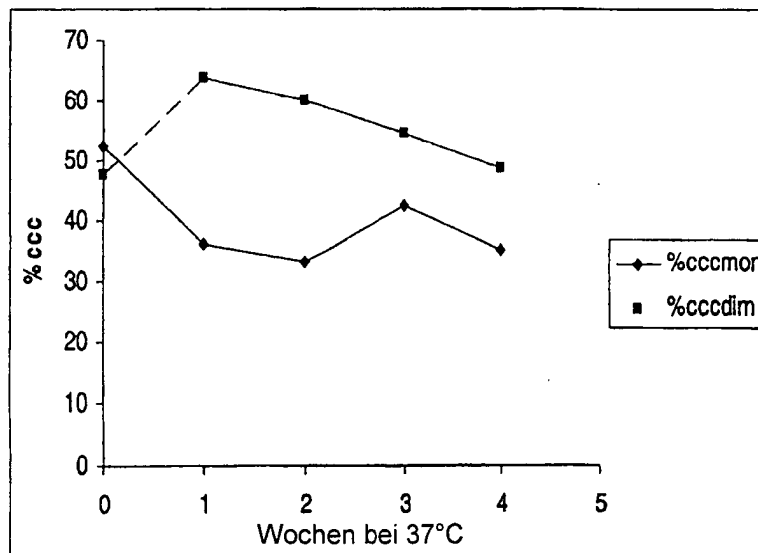


FIG 2C

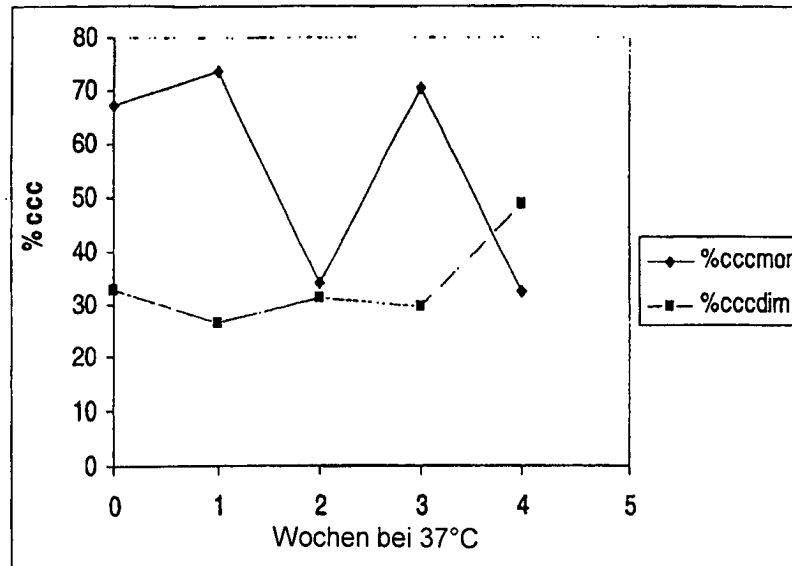


FIG 2D

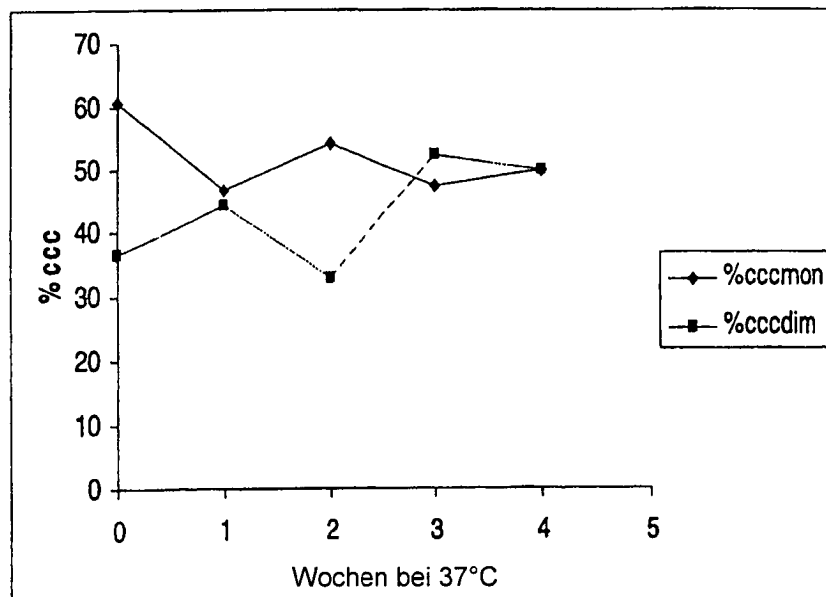


FIG 2E

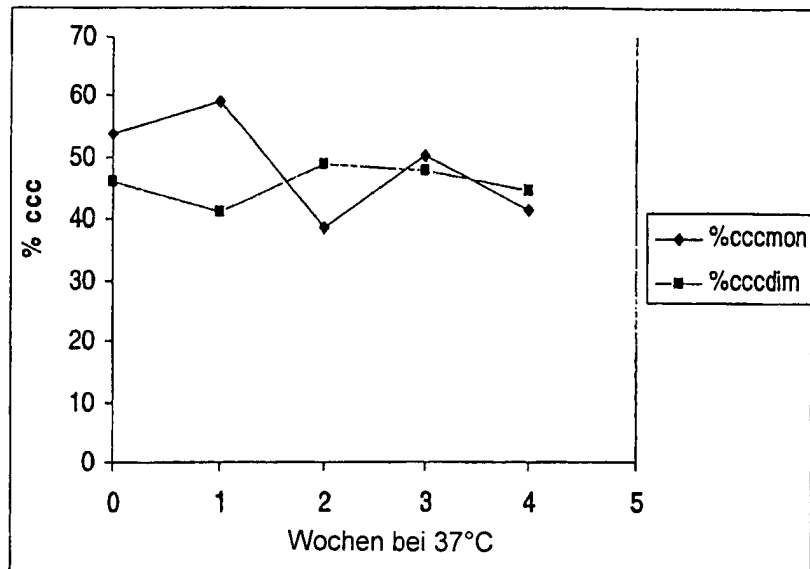


FIG 2F

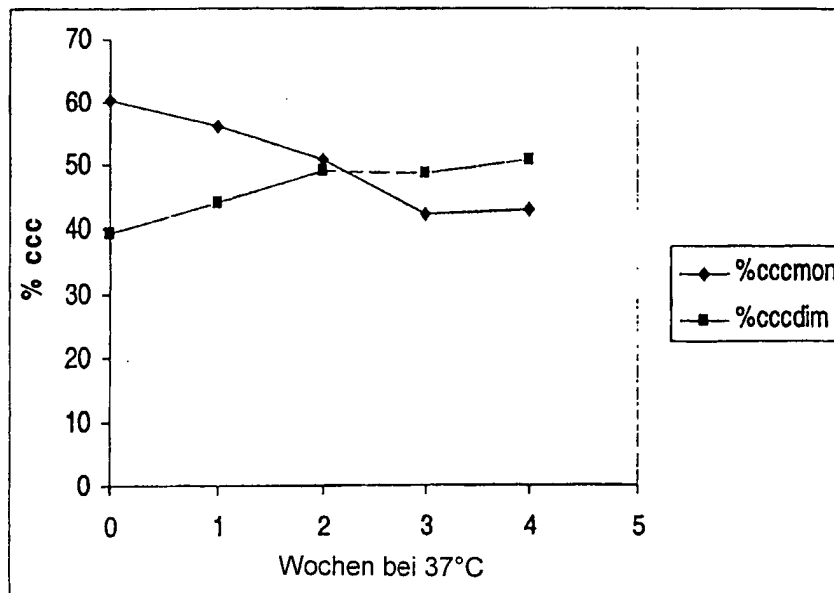


FIG 3A

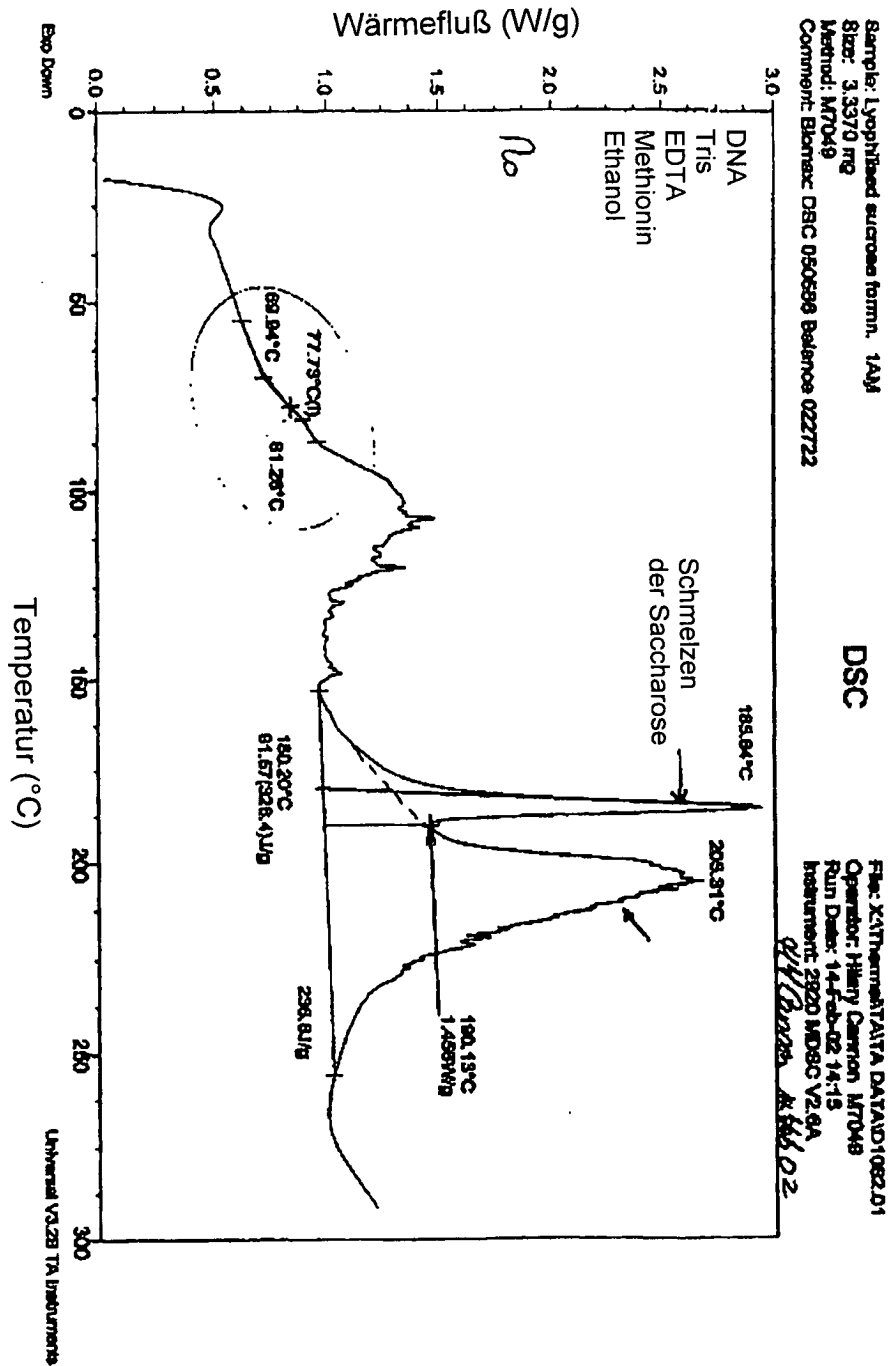


FIG 3B

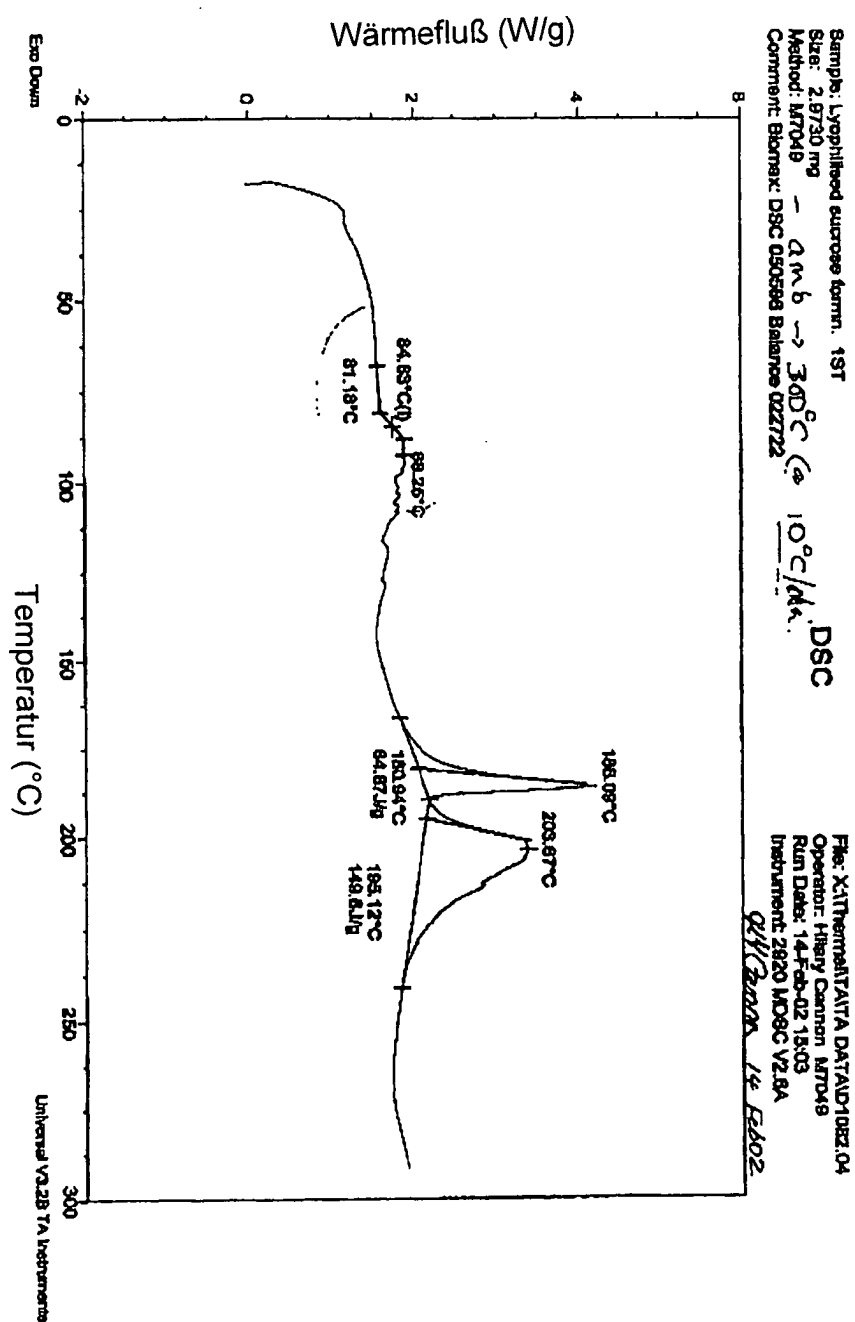


FIG 3C

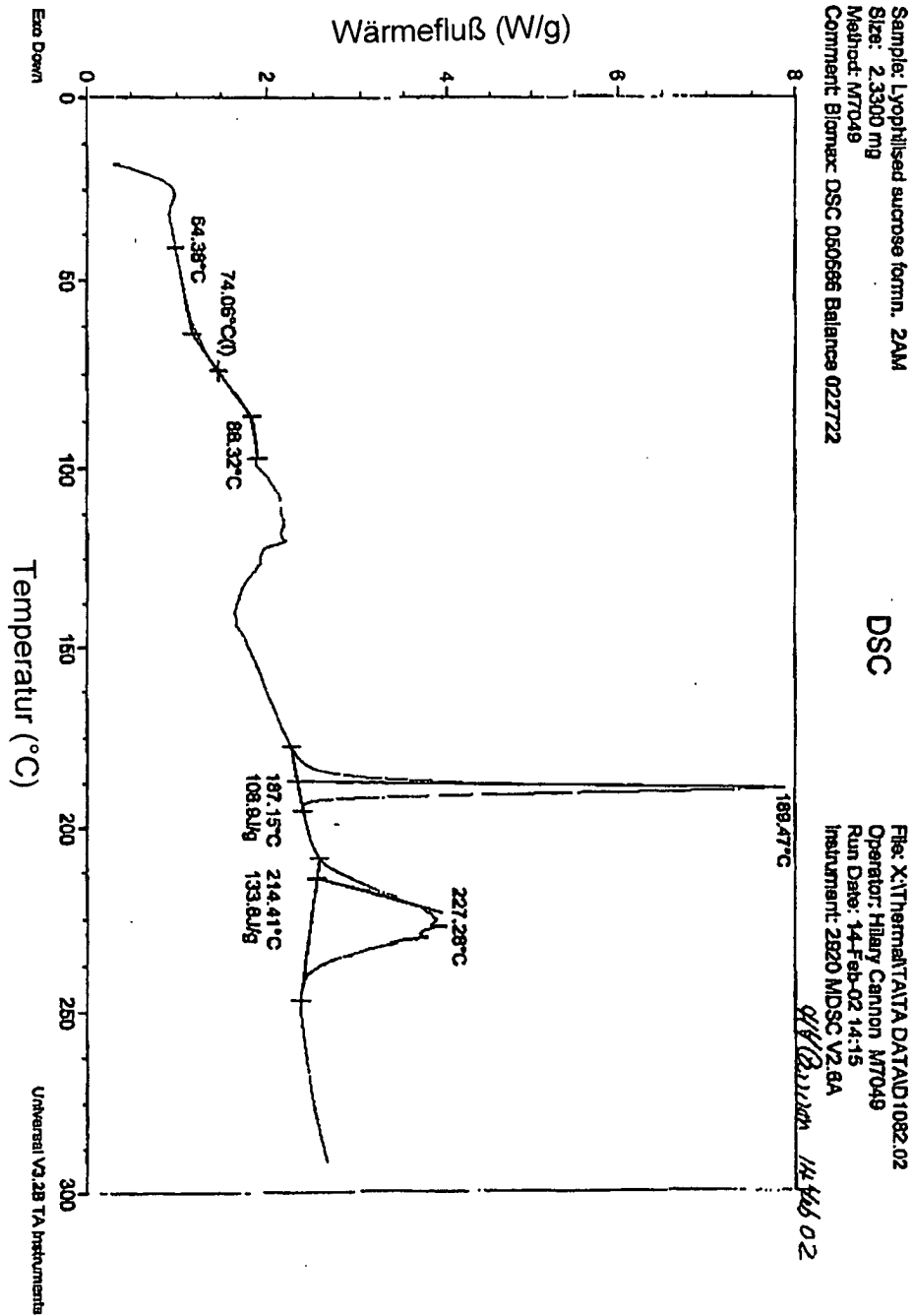


FIG 3D

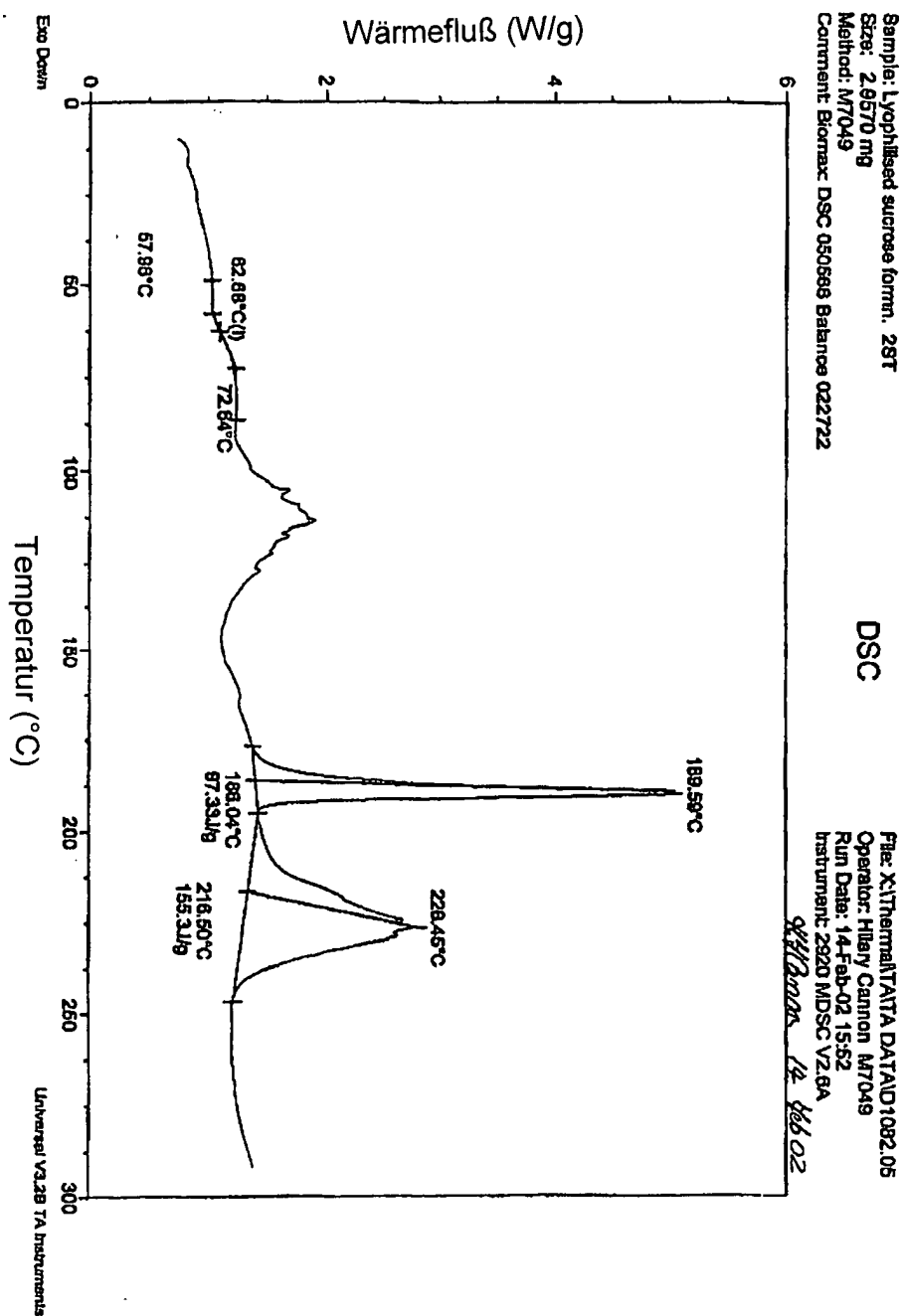


FIG 4A

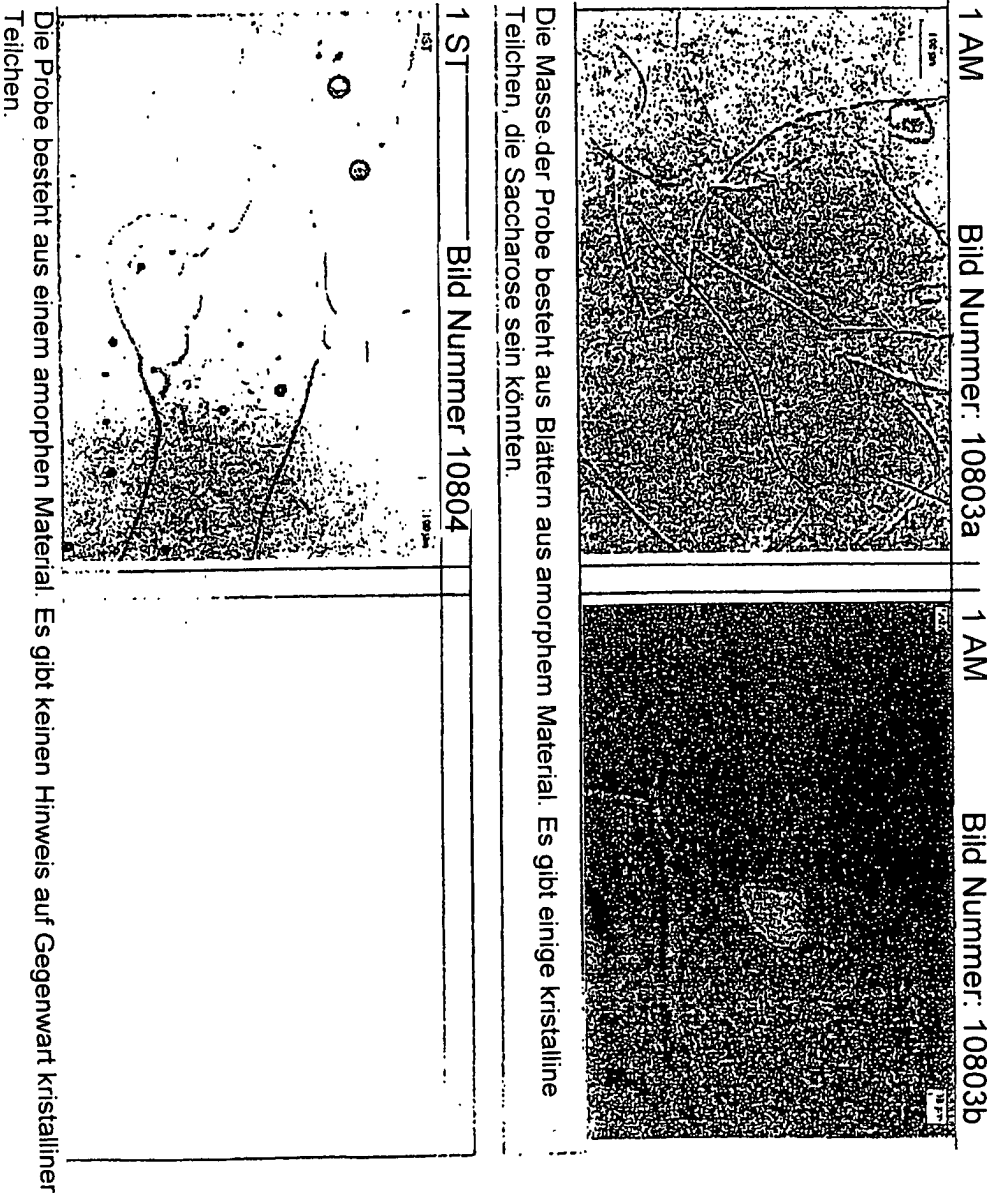


FIG 4B

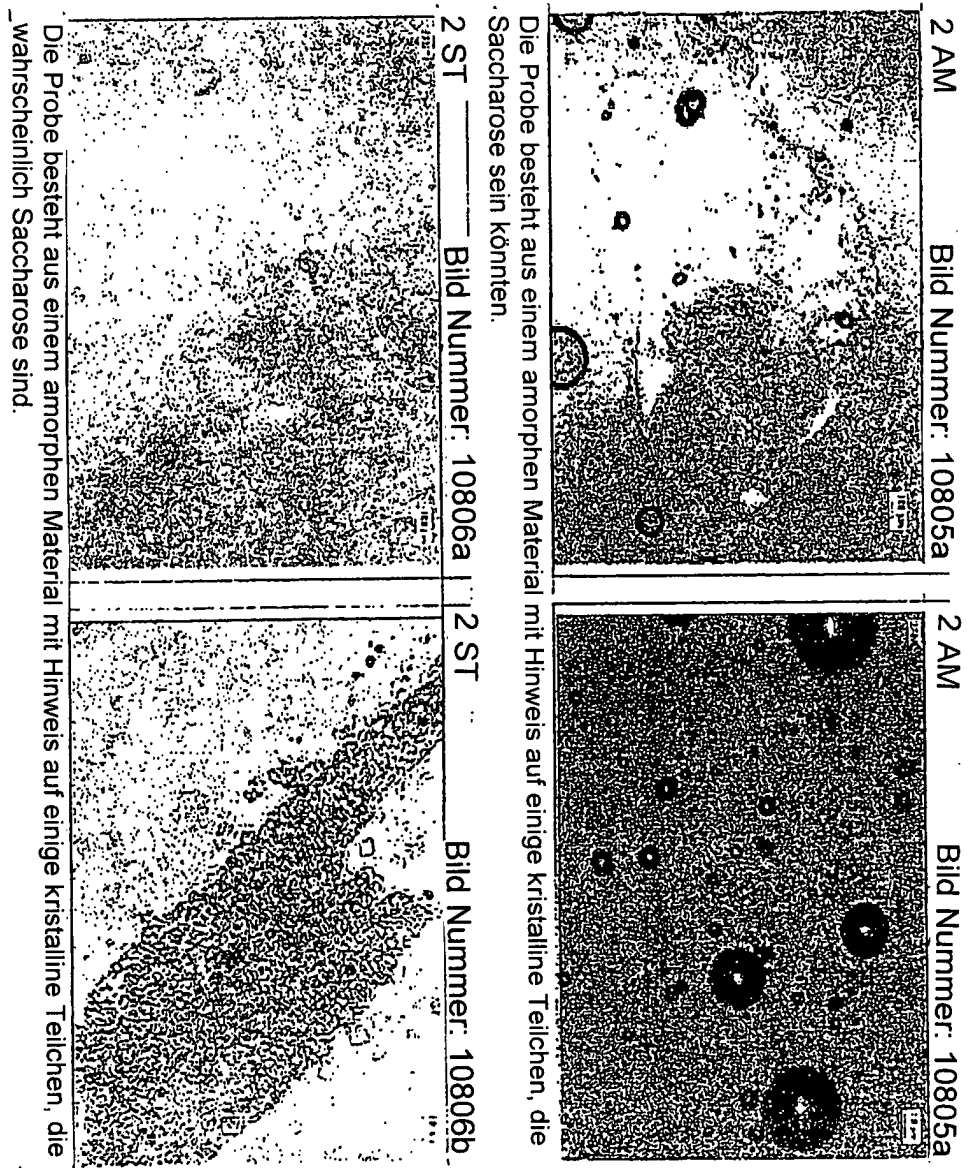


FIG 4C



FIG 4D

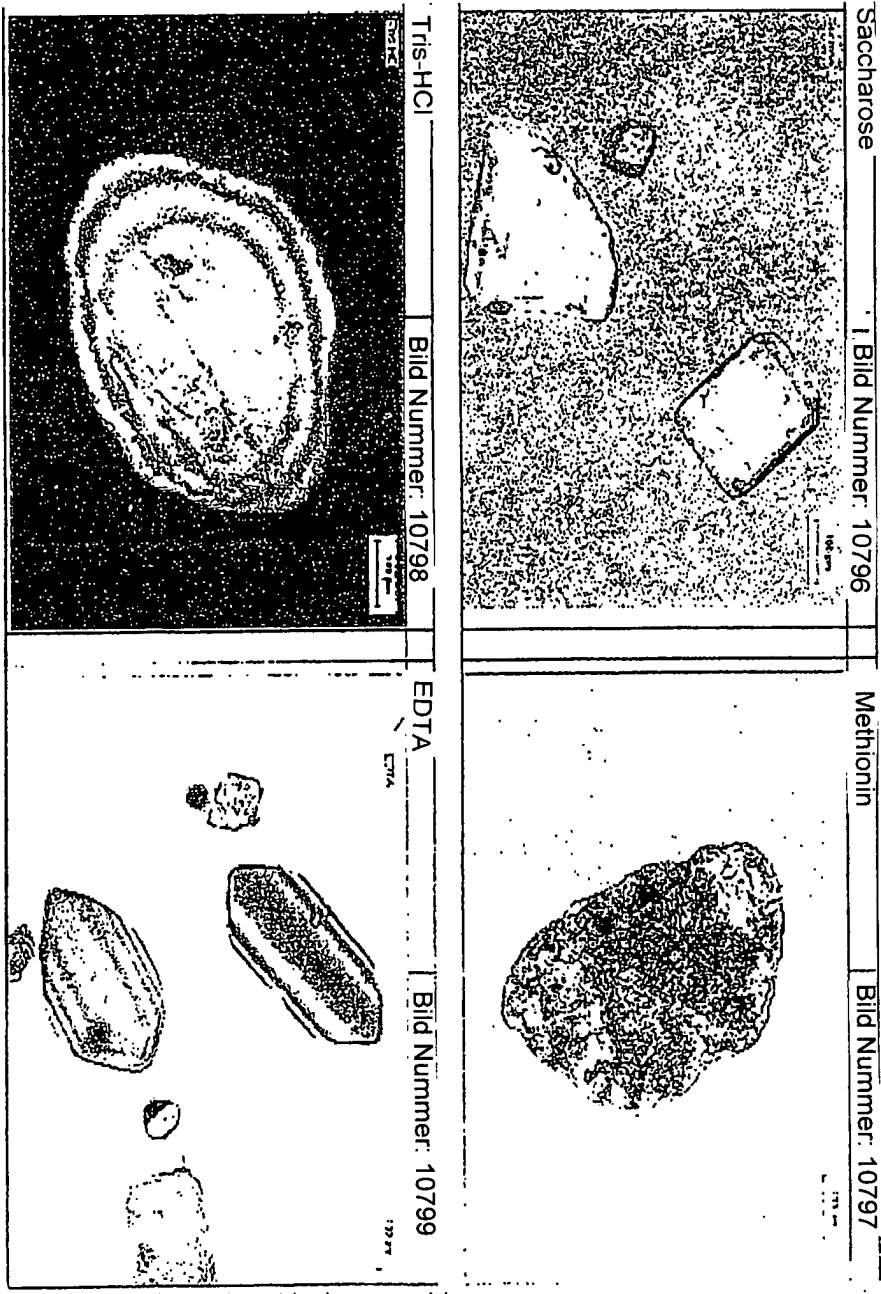


FIG 5A

Probe 1

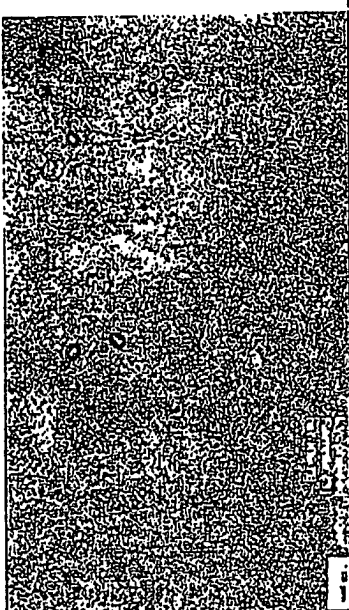
Bild Nr. 10977



Die Probe besteht aus Blättern aus amorphem Material mit wenig Hinweis auf vorhandenes kristallines Material.

Probe 3

Bild Nr. 10979



Die Probe besteht aus amorphem Material ohne Hinweis auf vorhandenes kristallines Material.

Probe 2,

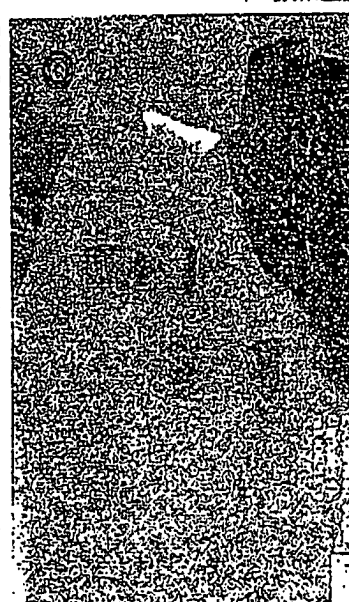
Bild Nr. 10978



Die Probe besteht aus weißem und schwarzem amorphem Material mit wenig Hinweis auf vorhandenes kristallines Material.

Probe 4

Bild Nr. 10980



Die Probe besteht aus Blättern aus amorphem Material ohne Hinweis auf vorhandenes kristallines Material.

FIG 5B

Probe 05

Bild Nr. 10981



Die Probe besteht aus Blättern aus amorphem Material ohne Hinweis auf vorhandenes kristallines Material.

Probe 07

Bild Nr. 10983



Die Probe besteht aus amorphem Material ohne Hinweis auf vorhandenes kristallines Material.

Probe 06

Bild Nr. 10982



Die Probe besteht aus schwarzem amorphem Material ohne Hinweis auf vorhandenes kristallines Material.

Probe 08

Bild Nr. 10984



Die Probe besteht aus amorphem Material ohne Hinweis auf vorhandenes kristallines Material.

FIG 6,

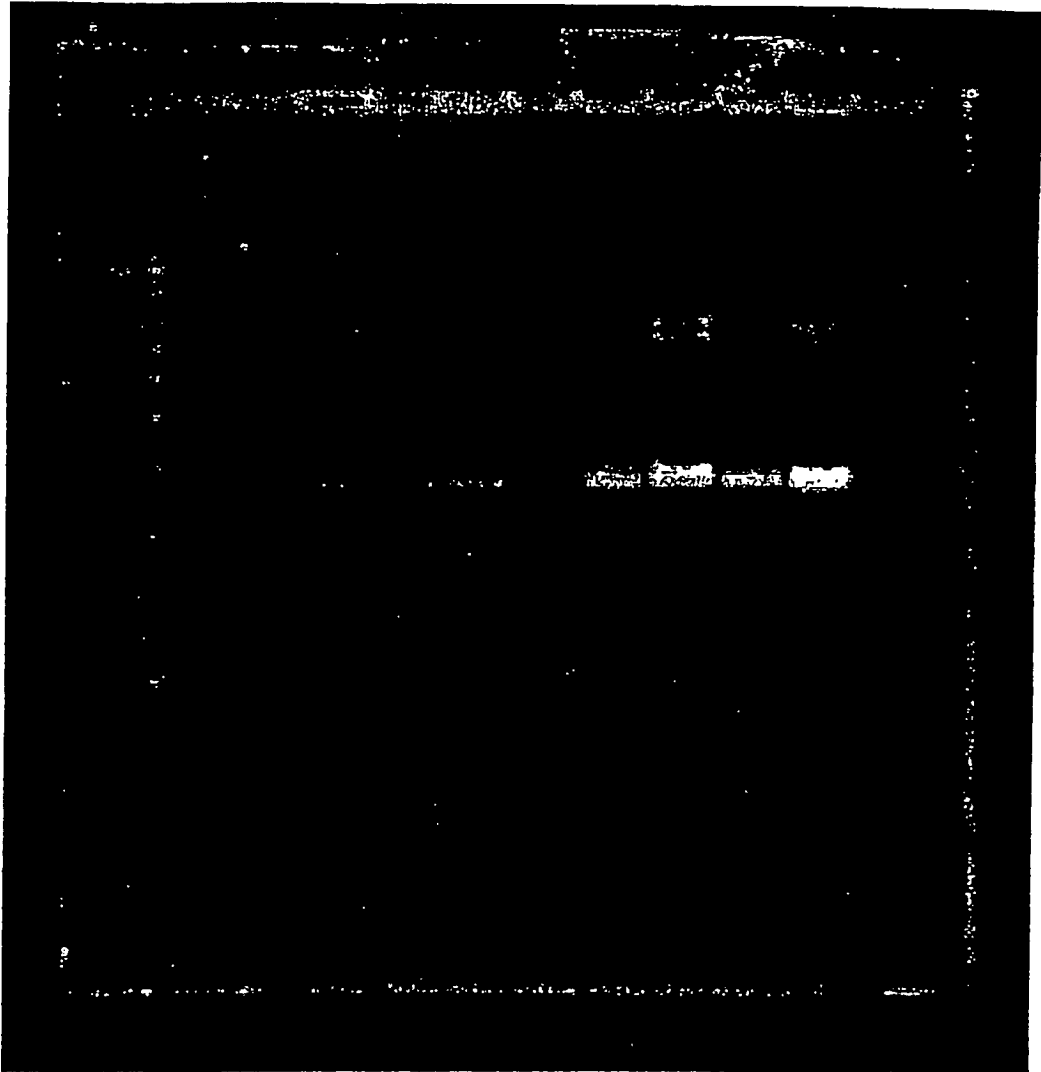


FIG 7,

