



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 322 572**

(51) Int. Cl.:

A61K 9/70 (2006.01)

C12N 15/89 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Número de solicitud europea: **03701595 .5**

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

(97) Número de publicación de la solicitud: **1467720**

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

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

(30) Prioridad: **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:
23.06.2009

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

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
23.06.2009

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

ES 2 322 572 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 de dosificación de ADN.

5 La presente invención se refiere a dispositivos eficaces para la administración de ADN basándose en agentes farmacéuticos en la piel de mamíferos. En un aspecto particularmente preferido de la presente invención, e proporcionan dispositivos para administración de vacunas de ADN en la piel del mamífero, y preferiblemente en la piel de un ser humano. La presente invención proporciona un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN de microaguja, que tiene al menos un elemento que perfora la piel que comprende un miembro de apoyo revestido con un medio de depósito sólido que contiene, en solución o suspensión sólida dentro del mismo, el agente farmacéutico de ADN, y un agente de estabilización que inhibe los efectos de degradación de los radicales libres. Preferiblemente, el medio de depósito farmacéutico sólido revestido sobre tales dispositivos es un poliol, siendo preferiblemente un poliol en un estado amorfo (tal como un vidrio). En el contexto de la presente invención el agente que establece el radicales libres preferiblemente un inactivador de radical libre y/o un quelante de ion metálico. Más preferiblemente, los dispositivos de vacuna de ADN de la presente invención, comprenden un plásmido de ADN, un inactivador de radical libre, y un quelante de ion metálico, en solución sólida dentro de un medio de depósito de azúcar vítreo, revestido sobre el miembro de apoyo. Los dispositivos de ADN de la presente invención son estables al almacenamiento, y solamente liberan de manera sustancial el compuesto farmacéutico de ADN después de la penetración de la parte que perfora la piel en la piel. Los dispositivos de administración del compuesto farmacéutico de ADN se proporcionan de manera que tal agente se administre en las capas definidas de la piel, y los dispositivos de administración preferidos comprenden partes que perforan la piel que administran el agente farmacéutico en el epitelio de la dermis. Los medios de depósitos preferidos comprenden azúcares, y en particular azúcares de estabilización que forman un vidrio tales como lactosa, rafinosa, trehalosa, glucosa o sacarosa. Además, se proporcionan dispositivos de administración de vacuna para la administración de vacunas en la piel, procedimientos de su fabricación, y su uso en medicina.

30 La piel representa una barrera significativa a los agentes externos. Un resumen de la piel humana se proporciona en el Diccionario Médico Ilustrado de Dorland, Edición 28. Partiendo de las capas externas, trabajando hacia adentro, la piel comprende el epitelio que comprende el estrato córneo, el epitelio viable, y el epitelio que subyacente es la dermis. El epitelio consta de cinco capas: Estrato córneo, Estrato lúcido, Estrato granuloso, Estrato espinoso, y Estrato basal. El epitelio (que incluye las cinco capas) es la capa más externa no vascular de la piel, y varía entre 0,07 y 0,12 mm de espesor (70 - 120 μm). El epitelio está poblado de queratinocitos, una célula que produce queratina y constituye el 95% de las células epidérmicas dedicadas. El otro 5% de las células son melanocitos. La dermis subyacente se encuentra normalmente dentro de un intervalo de 0,3 y aproximadamente 3 mm debajo de la superficie del estrato córneo, y contiene glándulas de sudor, folículos pilosos, terminaciones nerviosas y vasos sanguíneos.

40 El estrato córneo domina la barrera de permeabilidad de la piel y consta de unas pocas docenas de capas callosas, de epitelio queratinizado. Los intersticios estrechos entre los queratinocitos muertos o que están muriendo en esta región se llenan con capas multilamelares de lípidos cristalinos. Éstos sellan de manera eficaz los intersticios entre la piel o interior del cuerpo y los alrededores proporcionando que una barrera hidrófoba entre mediante moléculas hidrófilas. Estando el estrato córneo entre el intervalo de 30 - 70 μm de espesor.

45 Las células de Langerhans se encuentran en toda la fase granular basal del epitelio (estrato espinoso y estrato granuloso, (Small Animal Dermatology - Edición Tercera, Muller - Kirk - Scott, Ed: Saunders (1983)) y se considera que juegan un papel importante en la defensa inicial del sistema contra la invasión de organismos. Por lo tanto esta capa de la piel representa una zona diana ideal para ciertos tipos de vacuna.

50 Los modos convencionales para la administración de agentes farmacéuticos en o a través de la piel, lo más comúnmente mediante aguja y jeringa hipodérmica, están asociadas a numerosas desventajas. Tales desventajas incluyen dolor, el requerimiento de profesionales entrenados y para administrar el agente, y también el riesgo de lesiones producidas por la aguja para el administrador con el riesgo que acompaña de infección con una enfermedad de origen sanguíneo. Como tal, existe una necesidad de mejorar el procedimiento de administración de todos los tipos de compuestos farmacéuticos en o a través de la piel.

55 Se han descrito numerosos planteamientos alternativos con el fin de superar los problemas de administración del agente a través del estrato córneo, que incluye diversos diseños de parches cutáneos. Los ejemplos de parches cutáneos que administran el agente a través de la piel sin penetrar físicamente la capa del estrato córneo incluyen los descritos en los documentos WO 98/20734 y WO 99/43350. Otros planteamientos en los que la piel no se perfora físicamente incluyen dispositivos de electrotransporte, o iontoporéticos donde el paso del agente se potencia mediante la aplicación de una corriente eléctrica en la piel. Muchos de tales dispositivos se describen en la bibliografía (ejemplos de los cuales incluyen los documentos US 6.083.190; US 6.057.374; US 5.995.869; US 5.622.530, WO 00/44438). Las desventajas potenciales de estos tipos de parches de no penetración incluyen la inducción de sensibilización y molestia durante la administración del agente, y una captación muy escasa del antígeno a través del estrato córneo intacto.

65 Se han descrito otros parches que implican la ruptura o penetración física de la piel. Se han descrito los dispositivos que comprenden depósitos líquidos o sólidos que contienen agente y un parche de microcuchilla metálico en los que las microcuchillas físicamente cortan a través del estrato córneo para crear rutas a través de las cuales el agente puede entrar en el epitelio. Tales dispositivos se describen en los documentos WO 97/48440, WO 97/48442, WO 98/28037,

WO 99/29298, WO 99/29364, WO 99/29365, WO 00/05339, WO 00/05166, y WO 00/16833. Otros dispositivos que implican la perforación de la piel incluyen los documentos US 5.279.544, US 5.250.023 y US 3.964.482.

5 Las formas de dosificación de sólidos que comprenden un agente farmacéutico y un poliol estabilizante, tal como un azúcar en las que las formas de dosificación están en la forma de polvos y trocitos se describen en el documento WO 96/03978.

10 El ADN superenrollado en las preparaciones farmacéuticas se sabe que se degradan con el tiempo dando como resultado la pérdida de la estructura superenrollada y formación asociada de estructuras de ADN de círculo abierto o lineal (Evans *et al.*, 2000, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 89 (1), 76 - 87; documento WO 97/40839). Un mecanismo mediante el cual esta reacción de escisión se puede producir es la oxidación del ADN por radicales hidroxilo libres producidos del oxígeno disuelto en las soluciones de ADN, un proceso que está catalizado por iones metálicos. La reacción de formación de radicales libres puede estar catalizada por varios iones metálicos de transición, sin embargo los más comunes de los cuales son los iones de hierro y de cobre (Fe^{+3} , Fe^{+2} , Cu^{+2} o Cu^{+1} ; Evans *et al. supra*).

15 15 Se ha mostrado que la eliminación de iones metálicos de pequeña cantidad de soluciones que contienen ADN superenrollado con quelantes de iones metálicos, y/o eliminando los radicales libres en solución mediante inactivadores de radicales libre no reductores estabiliza el ADN en la forma superenrollada y protege al ADN de la oxidación (documento WO 97/40839).

20 20 Se conoce la administración de genes basada en plásmido, particularmente para propósitos de inmunización o terapia génica. Por ejemplo, la administración de ADN desnudo mediante inyección en músculo de ratón se esquematiza en el documento WO 90/11092. Johnston *et al* documento WO 91/07487 describen procedimientos de transferencia de un gen a células de vertebrado, mediante el uso de microproyectiles que se han revestido con un polinucleótido que 25 codifica un gen de interés, y acelerando las micropartículas de manera que las micropartículas puedan penetrar en la célula diana.

30 30 Las vacunas de ADN usualmente constan de un vector plásmido bacteriano en el que se inserta un fuerte promotor viral, el gen de interés que codifica secuencias de un péptido antígenico y de terminación de poliadenilación/de transcripción. El gen de interés puede codificar una proteína completa o simplemente una secuencia de péptido antígenico referente al patógeno, tumor u otro agente que se pretende que esté protegido contra ellos. El plásmido se puede desarrollar en bacterias, tal como por ejemplo *E. coli* y después aislarse y prepararse en un medio apropiado, dependiendo de la vía propuesta de administración, antes de administrarse al huésped. Después de la administración el plásmido es aceptado por las células del huésped donde se produce la proteína o péptido. El vector plásmido preferiblemente 35 se realiza sin un origen de replicación que es funcional en células eucarióticas, con el fin de evitar la replicación del plásmido en el huésped mamífero e integración dentro del ADN cromosómico del animal correspondiente. La información en relación a la vacunación de ADN se proporciona en Donnelly *et al* "ADN vaccines" Ann. Rev Immunol. 1997 15: 617 - 648. La vacunación de ADN también puede abarcar técnicas tales como la administración de vectores virales o bacterianos, que codifican y expresan el antígeno de la vacuna heterogéneo.

40 40 La presente invención supera los problemas de la técnica anterior y proporciona un dispositivo que es capaz de administrar y liberar los agentes de ADN de manera eficaz en la piel, y también en el que el ADN se establece de manera que se libera en su forma superenrollada.

45 **45 Descripción de las figuras**

Fig. 1 muestra los plásmidos usados en este estudio

50 A. pEGFP-C1, B. pGL3CMV, C. pVAC1.ova

Fig. 2 muestra electroforesis en gel de agarosa al 0,8% usando un gel E, para análisis de ADN de plásmido superenrollado, pEGFPC1, después de revestimiento por encima y elución de las agujas de coser.

55 Fig. 3 muestra electroforesis en gel de agarosa al 1,2% usando un gel E, para análisis de ADN de plásmido superenrollado, pEGFPC1, después de revestimiento por encima y elución de las agujas de coser.

60 Fig. 4 muestra electroforesis en gel de agarosa al 1,2% usando un gel E, para análisis de ADN de plásmido superenrollado, pGL3CMV, después de revestimiento por encima y elución de las agujas de coser almacenadas durante períodos de tiempo a 4°C.

Fig. 5 muestra electroforesis en gel de agarosa al 1%, en la ausencia de bromuro de etidio, (EtBr), para análisis de ADN de plásmido superenrollado, pGL3CMV, después de revestimiento por encima de agujas de coser.

65 Fig. 6 muestra electroforesis en gel de agarosa al 1,2% usando un gel E, para análisis de ADN de plásmido superenrollado, pGL3CMV, después de revestimiento por encima y elución inmediata de las agujas de coser o agujas hipodérmicas 30G.

ES 2 322 572 T3

Fig. 7 muestra electroforesis en gel de agarosa al 1%, en la ausencia de bromuro de etidio, (EtBr), para análisis de ADN de plásmido superenrollado, pVaclova, (resuspendido en una diversidad de formulación diferente a 5 μ g/ul), después de revestimiento por encima de agujas de coser o hipodérmicas de diferentes calibres y “liberación” en agarosa.

5

Fig. 8 muestra electroforesis en gel de agarosa al 1%, en la ausencia de bromuro de etidio, (EtBr), para análisis de ADN de plásmido superenrollado, pVaclova,

Fig. 9 muestra la actividad comparativa de luciferasa, (48 horas después de la transfección), derivado del plásmido 10 pGL3CMV, administrado o bien por vía intradérmica, (ID, Fig. 9A), o por vía intramuscular, (IM, Fig. 9B), a ratones, a partir de agujas hipodérmicas 30G revestidas con ADN comparado con los controles de administración convencional ID e IM convencional en solución salina.

Fig. 10 muestra la actividad comparativa de luciferasa, (48 horas después de la transfección), derivado del plásmido 15 pGL3CMV, administrado por vía intradérmica, (ID), a ratones, a partir de agujas hipodérmicas 30G revestidas con ADN y agujas de coser revestidas de ADN comparado con los controles de administración convencional ID en solución salina.

Fig. 11 muestra la actividad comparativa de luciferasa, (48 horas después de la transfección), derivado del plásmido 20 pGL3CMV, administrado o bien por vía intradérmica, (ID, Fig. 11A), o por vía intramuscular (IM, Fig. 11B), a ratones, a partir de pares de agujas de coser revestidas con ADN y comparado con 2 electrodos de disposición de agujas revestidas con ADN más electroporación.

Fig. 12 muestra la actividad comparativa de luciferasa, (48 horas después de la transfección), derivado del plásmido 25 pGL3CMV, administrado por vía intradérmica, (ID), a ratones, a partir de microagujas revestidas con ADN más electroporación mediante electrodos de calibre.

Fig. 13 muestra una representación gráfica del porcentaje de plásmido superenrollado, (%ccc), tanto formas de 30 plásmido monoméricas, (%cccmon), como diméricas, (%cccdim); después de revestimiento y liofilización sobre agujas de coser y almacenamiento a 37°C. Las formulaciones de plásmido usadas contienen cantidades variables de azúcares: Fig 13A: 5% de Sacarosa, Fig 13B: 10% de Sacarosa, Fig 13C: 17,5% de Sacarosa, Fig 13D: 40% de Sacarosa, Fig 13E: 40% de Trehalosa, Fig 13F: 40% de Glucosa.

Fig. 14 muestra los datos de calorimetría de barrido diferencial, (DSC), para formulaciones de ADN de plásmido, 35 (10 mg/ml), en 40% de sacarosa. Fig 14A y B: las formulaciones también contienen: 100 mM TrisHCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 10 mM metionina y 2,9% de etanol; Fig 14A y C representan un ciclo de liofilización de 24 horas; Fig 14B y D representan un ciclo de liofilización de 1 hora.

Fig. 15 muestra los datos de microscopía óptica polarizada, para el ADN de plásmido, (10 mg/ml), formulaciones 40 en 40% de sacarosa. Fig 15A: formulaciones también contienen: 100 mM TrisHCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 10 mM metionina y 2,9% de etanol, Fig 15C: solamente contiene 40% de sacarosa y la Fig 15D: muestra cristales de los excipientes descritos en la formulación mostrada en la Fig 15A. 1AM, 2AM y 3AM representan un ciclo de liofilización de 24 horas, mientras 1ST, 2ST y 3ST representan a un ciclo de liofilización de 1 hora.

Fig. 16 muestra los datos de microscopía óptica polarizada, para el ADN de plásmido liofilizado, (10 mg/ml), formulaciones en azúcares y polioles, que también contienen: 100 mM TrisHCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 10 mM metionina y 2,9% de etanol. Fig 16A, muestra 1: 40% p/v de ficol, muestra 2: 20% p/v de dextrano, muestra 3: 40% p/v de sacarosa, muestra 4: 20% p/v de maltotriosa. Fig. 16B muestra 5: 20% p/v de lactosa, muestra 6: 30% p/v de maltosa, muestra 7: 40% p/v de glucosa, muestra 8: 40% p/v de trehalosa.

50

La presente invención proporciona un dispositivo de distribución de agente farmacéutico basado en ADN de microaguja que tiene al menos una microaguja que perfora la piel que comprende un miembro de apoyo revestido con un medio de depósito sólido que contiene el agente farmacéutico de ADN, y un agente de estabilización que inhibe 55 los efectos degradantes de los radicales libres. Como alternativa, la microaguja que perfora la piel puede constar del medio de depósito del agente farmacéutico de ADN sin el miembro de apoyo.

Ciertas realizaciones de los dispositivos descritos en el presente documento también tienen la ventaja significativa 60 de almacenarse a temperatura ambiente reduciendo de esta manera los costes logísticos y liberación del espacio del refrigerador valioso para otros productos.

Las microagujas que perforan la piel, formadas mediante revestimiento de los miembros de apoyo con el medio de depósito sólido que contiene el agente a administrar, después de revestimiento con el medio de depósito sobre el miembro de apoyo, son suficientemente largas y suficientemente afiladas para perforar el estrato córneo de la piel. Una 65 vez que se ha administrado el dispositivo de administración del agente farmacéutico, y el miembro que perfora la piel o microaguja ha perforado el estrato córneo, el medio de depósito sólido se degrada biológicamente liberando por lo tanto el agente en la piel subyacente al estrato córneo.

Los dispositivos de administración de vacunas de ADN forman un aspecto preferido de la presente invención. En tales aplicaciones el agente a administrar es un polinucleótido que codifica un antígeno o antígenos que se pueden derivar de un patógeno tales como microorganismos o virus, o puede ser un auto antígeno en el caso de una vacuna de cáncer u otro auto antígeno.

5 Los miembros de apoyo, que cuando se revisten con medio de depósito para formar las microagujas que perforan la piel de los dispositivos de la presente invención, pueden estar hechos de casi cualquier material que se pueda usar para crear una protrusión que es lo suficientemente fuerte para resistir la perforación del estrato córneo, y que es seguro para el propósito. Por ejemplo las protrusiones se pueden realizar de un metal, tal como acero inoxidable, oro o titanio de calidad farmacéutica u otro de tales metales usados en prótesis, aleaciones de estos u otros metales; cerámica, semiconductores, silicio, polímeros, plásticos, vidrios o materiales compuestos.

10 Los dispositivos de administración pueden estar en la forma de una única aguja, trocar o cánula, o puede comprender elementos de perforación de la piel múltiples en la forma de un parche.

15 Los parches de la presente invención en general comprenden una placa de respaldo o estructura de soporte de la que depende una pluralidad de protrusiones de perforación tales como microagujas o microcuchillas. Las propias protrusiones de perforación pueden tomar muchas formas, y pueden ser sólidas o con huecos, y como tal se puede preparar en la forma de una aguja o cuchilla sólida (tal como los aspectos y diseños de microcuchilla descritos en

20 McAllister *et al.*, Annu. Rev. Biomed. Eng., 2000, 2, 289 - 313; Henry *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998, 87, 8, 922 - 925; Kaushik *et al.*, Anesth. Analg., 2001, 92, 502 - 504; McAllister *et al.*, Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 26, (1999), Controlled Release Society, Inc., 192 - 193; documentos WO 99/64580; WO 97/48440; WO 97/48442; WO 98/28037; WO 99/29364; WO 99/29365; US 5,879,326. Como alternativa, las protrusiones de perforación pueden estar en la forma de una microcánula que tiene un núcleo central con huecos. En esta última

25 realización, el núcleo central puede extenderse a través de la aguja para formar un canal que se comunica con ambos lados del dispositivo de microaguja (documento EP 0 796 128 B1). Se prefieren las agujas y microcuchillas sólidas.

30 La longitud de la microaguja que perfora la piel para la administración del ADN en la piel se puede variar dependiendo de la localización anatómica del parche que se va a administrar y la capa de piel a la que se desea administrar el agente farmacéutico en la especie de vacuna. Típicamente entre 1 μm y 3mm, preferiblemente entre 1 μm y 1 mm, preferiblemente entre 50 μm y 600 μm , y más preferiblemente entre 100 y 400 μm . La longitud de la microaguja que perfora la piel se puede seleccionar de acuerdo con el sitio elegido para la dirigir la administración del agente, a saber, preferiblemente, la dermis y lo más preferiblemente la epidermis. Los miembros de apoyo de los dispositivos de la presente invención pueden tomar la forma de, y fabricarse mediante los procedimientos descritos en los documentos US 5.879,326, WO 97/48440, WO 97/48442, WO 98/28037, WO 99/29298, WO 99/29364, WO 99/29365, WO 99/64580, WO 00/05339, WO 00/05166, o WO 00/16833; o McAllister *et al.*, Annu. Rev. Biomed. Eng., 2000, 2, 289 - 313; Henry *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998, 87, 8, 922 - 925; Kaushik *et al.*, Anesth. Analg., 2001, 92, 502 - 504; McAllister *et al.*, Proceed. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater., 26, (1999); Controlled Release Society, Inc., 192 - 193.

40 Los dispositivos de microcuchilla más preferidos a revestir con el medio de depósito del agente farmacéutico para formar los dispositivos de la presente invención se describen en el documento WO 99 48440 y Henry *et al.*, Journal of Pharmaceutical Sciences, 1998, 87, 8, 922 - 925.

45 Los dispositivos de la presente invención preferiblemente comprenden una pluralidad de microagujas que perforan la piel, preferiblemente hasta 1000 microagujas por dispositivo, más preferiblemente hasta 500 que perforan la piel microagujas por dispositivo.

50 Cuando la protrusión de perforación es sólida, puede ser plana o puede tener una sección transversal circular o poligonal. Las protrusiones pueden tener ejes lineales o en forma de huso y pueden ser planos o circulares, u otra forma poligonal, en sección transversal. Por ejemplo, las microcuchillas pueden tener una cuchilla curvada o estar formadas en surcos con sección en V. Como alternativa las protrusiones pueden tener formas más complejas para potenciar la adherencia y dinámica de fluidos tal como una estrella de cinco puntas.

55 Las microagujas que perforan la piel pueden ser integrales con la placa de respaldo o pueden estar unidas a ella. En el caso en el que las protrusiones puedan estar unidas a la placa, la protrusión de perforación puede estar formada del medio de depósito. Tales dispositivos pueden estar hechos mediante el moldeado mediante diseño o extrusión de un medio de depósito fundido que contiene el agente en puntos finos. Por ejemplo, el medio de depósito fundido se puede fundir directamente en una placa de respaldo mediante un cabezal de poros múltiples, donde el extrudido caliente se enfriá y se pega a la paca. Cuando se saca el extrudido se forma una serie de extremos puntiagudos.

60 Como una característica general de cualquier forma de protrusión de perforación, con el fin de mejorar la adherencia del depósito después de revestir, la superficie de la protrusión se puede hacer con textura. Por ejemplo, la superficie puede ser de grano grueso, con rizos o nervios. Además, las microcuchillas sólidas pueden además comprender perforaciones a través de los cuales, de manera que el depósito se pueda secar dentro y crear un lazo de depósito, para mantener el depósito en la cuchilla de manera más segura. En ciertas realizaciones, que incluyen formulaciones altamente solubles y liofilizadas que se pueden disgregar, se prefiere que el depósito que se puede disgregar se puede mantener de manera entera dentro de tales agujeros protegidos por lo tanto de la rotura durante la punción de la piel.

En una realización alternativa, las microagujas, miembros de apoyo o medio de depósito (o sus partes) se pueden separar de manera física del parche o placa de respaldo antes de la liberación de ADN. Por ejemplo, en la realización en la que las microagujas que perforan la piel (o al menos sus extremos) se forman a partir del propio depósito, después de la penetración de la piel las protrusiones de perforación se separa del soporte base permitiendo de esta manera que el parche se elimine de la piel, mientras que se deja el depósito detrás de la piel. La separación del depósito de la placa de respaldo puede ser mediante cizalladura física o mediante biodegradación de parte de las agujas adyacentes a la placa de respaldo.

Una realización de esto puede ser fundir los extremos de microprotrusión fuera del medio de depósito de disacáridos escasamente soluble (que contiene una dispersión del agente a administrar) seguido del moldeado de la parte restante de la microprotrusión y placa de respaldo fuera de un material relativamente fácilmente soluble. Una vez insertado en la piel, el eje de microprotrusión fácilmente soluble se degradará, permitiendo por lo tanto que el parche se elimine de la piel, mientras que deja los extremos dentro de la piel. Los extremos, que quedan en la piel después pueden liberar lentamente el agente mediante la degradación biológica más lenta.

En otra realización relacionada de la presente invención los dispositivos pueden ser dispositivos de electroporación. Por ejemplo el documento US 6261281 describe vacunación de ADN intramuscular seguida de la inserción de electrodos para pasar una corriente eléctrica a través de las células musculares para potenciar la captación de ADN en las células. El documento WO 00/44438 describes parches de aguja revestidas con ADN en la ausencia de medio de depósito, usándose las agujas metálicas como electrodos. De acuerdo con lo anterior se proporciona un dispositivo de electroporación que comprende una pluralidad de elementos que perforan la piel que comprenden un miembro de apoyo revestido con un medio de depósito sólido amorfo que contiene el agente farmacéutico de ADN, y un agente de estabilización que inhibe los efectos degradantes de los radicales libres. Una realización preferida de esto son los dispositivos descritos en el documento WO 00/44438 cuyas agujas están revestidas con un medio de depósito amorfo que contiene una vacuna de ADN y un agente de estabilización que inhibe los efectos de degradación de los radicales libres.

El depósito del agente biodegradable de poliol puede ser cualquiera hecho de cualquier medio que realiza la función requerida para la presente invención. El depósito debe ser capaz de adherirse al miembro de apoyo hasta un grado suficiente para que el depósito permanezca de manera estable y se una durante el almacenamiento prolongado, y también permanezca sustancialmente intacto durante el procedimiento de administración cuando las microagujas perforan el estrato córneo. El depósito también debe de ser capaz de mantener o contener una suspensión o solución de agente para que se distribuya 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 significa que el medio de depósito cambia de estado, de manera que cambia de su estado de no liberación a liberación mediante el cual el agente entra en la piel. La liberación del agente activo puede implicar uno o más procedimientos 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 degradación biológica se puede inducir mediante uno o más de los siguientes: agua, fluidos corporales, humedad, temperatura del cuerpo, enzimas, catalizadores y/o reactivos. El cambio del medio de depósito por lo tanto puede estar inducido por hidratación, y calentamiento asociado a la mayor humedad y temperatura de la piel. El medio de depósito se puede después degradar y/o hincha y/o fase de cambio (cristalina o amorfa), disgregando por lo tanto o solamente incrementando la permeación del medio.

Preferiblemente se disuelve el medio, y se metaboliza o expulsa o segregá, pero el depósito puede como alternativa permanecer unido al miembro de soporte de la piel cuando se retira el dispositivo. Se prefiere la liberación del agente mediante disolución del medio de depósito.

Preferiblemente el medio de depósito sólido es un poliol (tal como los descritos en el documento WO 96/03978). El medio de depósito sólido adecuado incluye carbohidratos (tales como azúcares), polisacáridos, polioles sustituidos tales como carbohidratos derivados hidrofóbicamente, aminoácidos, polímeros biodegradables o copolímeros tales como poli(hidroxi ácido)s, polianhídridos, poli(orto)estéres, poliuretanos, poli(ácido butírico)s, poli(ácido valérico)s, y poli(lactida-co-caprolactona)s, o polilactida co-glicolida.

El depósito sólido puede estar en un estado amorfo o cristalino y también puede ser amorfo parcialmente y parcialmente cristalino. Sin embargo lo más preferiblemente, todos o sustancialmente todo el depósito está en un estado amorfo. Todavía más preferiblemente es que el depósito amorfo esté en la forma de un vidrio (documento US 5.098.893). Lo más preferiblemente el depósito es un cristal de azúcar.

Los medios de depósito particularmente preferidos son los que estabilizan el agente a administrar durante el período de almacenamiento. Por ejemplo, antígeno o agente disuelto o dispersado en un vidrio de poliol o simplemente secado en un poliol son estables al almacenamiento durante períodos prolongados de tiempo (documentos 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 medio de depósito.

Los polioles preferidos incluyen azúcares, que incluyen mono, di, tri, u oligo sacáridos y sus alcoholes de azúcar correspondientes. Los azúcares adecuados para uso en la presente invención se conocen bien en la técnica e inclu-

yen, trehalosa, glucosa, sacarosa, lactosa, fructosa, galactosa, manosa, maltulosa, iso-maltulosa y lactulosa, maltosa, o dextrosa y alcoholes de azúcar de los mencionados anteriormente tales como manitol, lactitol y maltitol. Se prefieren Sacarosa, Lactosa, Rafinosa y Trehalosa. Los más preferidos son glucosa, trehalosa o sacarosa.

5 Preferiblemente el ADN y agente de estabilizador están en una solución sólida dentro del amorfio, y preferiblemente medio de depósito vítreo.

10 Se prefiere que el medio de depósito forme un vidrio amorfio tras secado. El depósito de vidrio puede tener cualquier temperatura de transición vítreo, pero preferiblemente tiene una temperatura de transición vítreo que tanto estabiliza el agente farmacéutico durante el almacenamiento como también facilita la rápida liberación del agente después de la inserción del depósito en la piel. De acuerdo con lo anterior, la temperatura de transición vítreo es mayor que las temperaturas de almacenamiento ambientes, pero puede ser que sea aproximadamente la temperatura corporal (tal como, pero sin limitación a 35 - 50°C).

15 15 El medio de depósito preferido usado para revestir los miembros que perforan la piel de los dispositivos son los que liberan el agente farmacéutico durante un corto período de tiempo. Las formulaciones de depósito preferidas liberan sustancialmente todo el agente dentro de 10 minutos, más preferiblemente dentro de 5 minutos, más preferiblemente dentro de 2 minutos, más preferiblemente dentro de 1 minuto, y lo más preferiblemente dentro de 30 segundos de inserción en un gel de agarosa al 1%. Cuando las formulaciones se usan para administrar ADN a la piel se prefiere que se libere suficiente ADN para proporcionar su efecto biológico dentro de 24 horas de administración a la piel, preferiblemente se libera suficiente ADN dentro de 8 horas y lo más preferiblemente dentro de 1 hora de administración a la piel. Tales depósitos de liberación rápida se pueden lograr, por ejemplo, mediante revestimientos delgados de depósitos de vidrio amorfos, particularmente depósitos de vidrio de disolución/hinchamiento rápido que tienen bajas temperaturas de transición. Será evidente para los expertos en la técnica que se puede lograr una baja temperatura de transición vítreo seleccionando el azúcar que forma vidrio apropiado, y/o incrementando la humedad y/o resistencia iónica del vidrio. De manera adicional, el aumento de velocidad de la disolución de los depósitos de vidrio también se puede lograr mediante calentamiento del dispositivo antes o durante la aplicación a la piel, hidratando previamente la piel o mediante la administración de líquido al mismo tiempo que se insertan las microagujas en la piel (tal como inyectando líquido a través de los taladros de las microcáñulas revestidas del depósito seco) o añadiendo agentes adicionales a la formulación con el fin de disminuir el tiempo de disolución.

20 25 El componente de ADN de la presente invención puede ser ADN de plásmido lineal o circular abierto o superenrollado, pero puede en una forma relacionada de la presente invención estar el ADN en la forma de un vector bacteriano o viral atenuado vivo.

30 35 Preferiblemente el ADN está en la forma de un plásmido superenrollado. Una ventaja principal de la presente invención para estas formulaciones es el hecho que el ADN está estabilizado de manera que tras la liberación, permanece en gran medida en su forma superenrollada, y preferiblemente en su forma superenrollada monomérica.

40 45 La estabilidad del ADN de plásmido se puede definir en un número de formas y puede ser un fenómeno relativo determinado por las condiciones de almacenamiento tales como pH, humedad y temperatura. Para almacenamiento en la presencia de iones de hierro en el depósito revestido, preferiblemente > 50% de plásmido permanece superenrollado, (ccc, circular cerrado covalentemente), tras almacenamiento durante 3 meses a 4°C. Más preferiblemente, en las condiciones de almacenamiento descritas, > 60% del plásmido permanece ccc y más preferiblemente, en estas estas 50 condiciones de almacenamiento, > 90% del plásmido permanece ccc durante 3 meses a 4°C. Para revestimiento en agujas o microagujas basado en ion no metálico, la estabilidad de ADN de plásmido sería preferiblemente > 60% y más preferiblemente 80% y lo más preferiblemente > 90% ccc después de 3 meses de almacenamiento a 4°C. Más preferiblemente, en estas condiciones de almacenamiento, > 90% de plásmido permanece ccc durante 1 año a 4°C, y más preferiblemente > 90% de plásmido permanece ccc durante 2 años a 4°C. Lo más preferiblemente la estabilidad del ADN superior se logra en estas condiciones durante los mismos períodos de tiempo a 25°C.

55 60 El ADN dentro de un medio de depósito sólido revestido sobre agujas de coser está preferiblemente estabilizado en su forma superenrollada (ccc) durante los estudios de estabilidad acelerada, y lo más preferiblemente el ADN está estabilizado en su forma monomérica ccc. Un ejemplo de un estudio de estabilidad acelerada en los que las agujas revestidas se mantienen a 37°C durante 4 semanas seguido de análisis de la estructura de ADN con el tiempo. En este tipo de estudio (como se describe en el Ejemplo 12), preferiblemente mayor que 50% del ADN permanece en su forma ccc, más preferiblemente mayor que 60% permanece en su forma ccc, más preferiblemente mayor que 70% permanece en su forma ccc, más preferiblemente mayor que 80% permanece en su forma ccc y lo más preferiblemente mayor que 90% permanece en su forma ccc. En estas condiciones, y niveles preferidos de ccc, también se prefiere que la relación de ADN ccc monomérico:dimérico sea aproximadamente 1 (tal como dentro del intervalo 0,8 - 1,2, o más preferiblemente dentro del intervalo de 0,9 - 1,1 y lo más preferiblemente dentro del intervalo de 0,95 - 1,5), o mayor que 1.

65 Los estudios para determinar la estabilidad del plásmido son bien conocidos por los expertos en la técnica y se describen en (Evans *et al.*, *Supra*; documento WO 97/40839). Éstos incluyen técnicas para medir y cuantificar el porcentaje de ADN superenrollado, ccc, o bien mediante electroforesis de gel de agarosa, HPLC de intercambio aniónico, (Ferreira, G. *et al.*, 1999, *Pharm. Pharmacol. Commun.*, 5, p 57 - 59), o electroforesis de gel capilar, (Schmidt

et al., 1999, Anal. Biochem., 274, 235 - 240). La relación de ccc monomérico:dimérico se puede medir mediante análisis de intensidad de imagen después de electroforesis de gel de agarosa (en la ausencia de cualesquiera agentes de intercalación) y tinción de EtBr, usando el software comercialmente disponible tal como Labworks 4.0 que se desarrolla sobre un sistema UVP Bioimaging.

5 Los medios de depósito de la presente invención contienen un agente de estabilización que inhibe los efectos degradantes de los radicales libres. Los agentes de estabilización preferidos incluyen agentes de estabilización quelantes de iones metálicos, mientras que los agentes quelantes de iones metálicos preferidos incluyen inositol hexafosfato, tripolifosfato, ácido succínico y málico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), tris (hidroximetil) amino metano (TRIS), Desferal, ácido dietilentriaminapentaacético acid (DTPA) y ácido etilendiamindihidroxifenilacético (EDD-HA). Otros agentes de estabilización preferidos son inactivadores de radicales libres no reductores, y preferiblemente tales agentes son etanol, metionina o glutatión. Otros quelantes e inactivadores adecuados (y los que no son adecuados) se pueden identificar fácilmente por los expertos en la técnica mediante experimentación de rutina (como se describe en el documento WO 97/40839).

10 15 Las cantidades de los componentes presentes se pueden determinar por los expertos en la técnica, pero en general están en el intervalo de 0,1 - 10 mM para los quelantes de iones metálicos, Etanol está presente en una cantidad de hasta aproximadamente 5% (v/v), metionina está presente a aproximadamente 0,1 a 100 mM y Glutatión está presente a aproximadamente 0,1 a 10% (v/v).

20 25 Las combinaciones preferidas de los agentes de estabilización son (a) solución de etanol tamponada con fosfato con metionina o EDTA, (b) EDTA tamponado con Tris en combinación con metionina o etanol (o las combinaciones de metionina y etanol).

30 35 Las formulaciones particularmente preferidas que se pueden combinar con el ADN y los polioles: sacarosa o trehalosa en agua desmetalizada o tampones basados en Fosfato o Tris y después secados sobre los dispositivos de la presente invención son:

- A. 10 mM de metionina y 2,9% de etanol
- B. 3,7% de etanol y 1 mM de EDTA
- C. 100 mM de Tris, 1 mM de EDTA y 10 mM de metionina y 2,9% de etanol
- D. 100 mM de Tris, 1 mM de EDTA y 10 mM de metionina
- E. 100 mM de Tris, 1 mM de EDTA y 2,9% de etanol

40 45 El medio de depósito sólido en los dispositivos de la presente invención contiene un agente quelante de iones metálicos o un inactivador de radicales libres no reductores. Lo más preferiblemente el medio de depósito sólido en los dispositivos de la presente invención contienen tanto un agente quelante de iones metálicos como un inactivador de radicales libre no reductores.

50 55 Además de estos agentes de estabilización, se pueden aceptar etapas adicionales para potenciar la estabilidad del ADN en las vacunas sólidas. Por ejemplo, las formulaciones se pueden preparar usando soluciones que ellas mismas se desmetalizan antes de uso (por ejemplo mediante el uso de resina de desmetalización comercialmente disponible tal como Chelex 100 de Biorad) y/o la formulación se puede finalizar en un pH alto (tal como pH 8 - 10).

60 Las formulaciones que comprenden el agente a administrar y medio de depósito biodegradable están preferiblemente mezcladas en solución acuosa y después se secan sobre el medio de soporte o la formulación se pueden fundir y después aplicar al miembro de apoyo. Un procedimiento preferido para revestir los miembros de apoyo comprende la preparación de una solución acuosa de antígeno de vacuna y poliol soluble en agua (tal como trehalosa), seguido de revestimiento de la solución sobre los miembros de apoyo mediante inmersión del miembro en la solución una o más veces seguido de secado a temperatura ambiente o liofilización para proporcionar un revestimiento poroso. En este procedimiento se prefiere que la solución inicial del poliol o azúcares solubles en agua sea viscosa, tal como la viscosidad lograda de azúcar al 40%.

65 70 Como alternativa, volúmenes pequeños de picolitros de formulación en solución o fundida se pueden pulverizar sobre miembros de apoyo individuales mediante la tecnología usada de manera habitual en la técnica de impresoras de inyección de burbuja, seguido de secado. Un procedimiento alternativo sería preparar microesferas o micropartículas o polvos de formulación amorfa que contienen poliol tal como azúcar, usando técnicas conocidas en la técnica (tal como secado por pulverización o congelación por pulverización o secado y molienda) y controlando el contenido de humedad para lograr una temperatura de transición vítreo relativamente baja (por ejemplo 30°C), seguido de pulverización o inmersión para poner en contacto las microesferas o micropartículas o polvos con el miembro de apoyo calentado a una temperatura por encima de la temperatura de transición vítreo de la microesfera (por ejemplo 45°C). Las partículas revestidas después se fundirían y se adherirían al miembro de apoyo y después secarían o el miembro de soporte revestido se secaría de manera adicional (para eliminar el contenido de humedad residual) incrementando por lo tanto la temperatura de transición vítreo del medio de depósito adecuado para almacenamiento.

Como alternativa, el miembro de apoyo se puede revestir usando una técnica de revestimiento por congelación. Por ejemplo, la temperatura del miembro de soporte de microaguja se puede reducir hasta por debajo del punto de congelación del agua (por ejemplo mediante inmersión en nitrógeno líquido) y después las soluciones acuosas del medio de depósito y agente se pueden pulverizar sobre los miembros de apoyo fríos, o los miembros de apoyo se 5 pueden sumergir en la solución del agente. De este modo el agente y medio de depósito se adhiere de manera rápida al miembro de apoyo de la microaguja, que después se sublimar mediante liofilización, o evaporarse a temperaturas más altas, para secar el revestimiento del depósito.

Otro procedimiento para revestir el apoyo de microaguja es sumergirlas en un disolvente, tal como agua (que 10 comprende opcionalmente un tensioactivo para asegurar un buen contacto) después sumergiendo los miembros de apoyo húmedo en una forma en polvo del medio de depósito que es soluble en el disolvente, seguido de secado para eliminar el disolvente.

En una realización preferida de la invención se proporciona un procedimiento para revestir un miembro de apoyo 15 con una solución viscosa de depósito que forma el medio que es suficientemente fluido para permitir la filtración estéril a través de una membrana de poro de 220 nm. De acuerdo con lo anterior se proporciona una formulación de vacuna que comprende un antígeno en una formulación de solución de azúcar viscosa que se puede filtrar. Los ejemplos preferidos de tales soluciones de azúcar viscosa son soluciones de entre aproximadamente 20 y aproximadamente 20 50% de azúcar (peso/volumen de la formulación de vacuna final antes de secar). Más preferiblemente las soluciones de azúcar que se puede filtrar están en el intervalo de aproximadamente 30% y aproximadamente 45% de azúcar, y lo más preferible son aproximadamente 40% (peso azúcar/volumen de la formulación de vacuna final antes de secar). En este contexto las soluciones de azúcar más preferidas comprenden sacarosa, rafinosa, trehalosa, glucosa o lactosa.

25 Las soluciones de azúcar de alta concentración (por ejemplo, 20 - 40%) se prefieren a medida que esto incrementa la estabilidad del ADN en su forma ccc monomérica.

Usando estas técnicas cada microaguja que perfora la piel se puede cargar con cantidades relativamente altas de agente farmacéutico. Estando cada miembro de perforación preferiblemente cargado con hasta 500 ng de ADN farmacéutico, más preferiblemente hasta 1 μ g de ADN farmacéutico, más preferiblemente hasta 5 μ g de ADN farmacéutico y lo más preferiblemente hasta 10 μ g de ADN farmacéutico.

Preferiblemente las formulaciones de vacuna de la presente invención contienen ADN que codifica un antígeno o composición antigénica capaz de provocar una respuesta inmune contra un patógeno humano, dicho antígeno o composición antigénica se deriva VIH-1, (tal como tat, nef, gp120 o gp160), virus herpes humanos, tal como gD o sus derivados o Proteína Temprana Inmediata tal como ICP27 de HSV1 o HSV2, citomegalovirus ((esp Human) (tal como gB o sus derivados), Rotavirus (que incluyen virus atenuados vivos), virus Epstein Barr (tal como gp350 o sus derivados), virus Varicella Zoster (tal como gPI, II y IE63), o de un virus de hepatitis virus tal como virus de hepatitis B (por ejemplo antígeno superficial de Hepatitis B o su derivado), virus de hepatitis A, virus de hepatitis C virus y virus de hepatitis E, o de otros patógenos virales tales como paramixovirus: Virus Sincitial Respiratorio (tal como proteínas F y G o sus derivados), virus de parainfluenza, virus de sarampión, virus de paperas, virus de papiloma humano (por ejemplo HPV6, 11, 16, 18, ..), flavivirus (por ejemplo, virus de la Fiebre Amarilla, virus de Dengue, virus de encefalitis de garrapata, virus de Encefalitis Japonesa) o virus de Influenza (virus completos inactivados o vivos, virus de influenza dividido, desarrollado en huevos o células MDCK, o células Vero o virosomas completos flu (como se describe por R. Gluck, Vaccine, 1992, 10, 915 - 920) o sus proteínas purificadas o recombinantes, tales como proteínas HA, NP, NA, o M, o sus combinaciones), o derivados de patógenos bacterianos tales como *Neisseria spp*, incluyendo *N. gonorrhoea* y *N. meningitidis* (por ejemplo polisacáridos capsulares y sus conjugados, proteínas de unión a transferían transferrina, proteínas de unión a lactoferrina, PilC, adhesinas); *S. pyogenes* (por ejemplo proteínas M proteins o sus fragmentos, C5A proteasa, ácidos lipoteicoicos), *S. agalactiae*, *S. mutans*; *H. ducreyi*; *Moraxella spp*, incluyendo *M. catarrhalis*, también conocido como *Branhamella catarrhalis* (por ejemplo adhesinas a invasinas de alto y bajo peso molecular); *Bordetella spp*, incluyendo *B. pertussis* (por ejemplo pertactina, toxina pertussis o sus derivados, hemaglutinina filamentosa, adenilato ciclase, fimbriae), *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 sus derivados, toxina lábil al calor o sus derivados), *E. coli* enterohemorrágica, *E. coli* enteropatogénica (por ejemplo toxina de tipo toxina shiga o sus derivados); *Vibrio spp*, incluyendo *V. cholera* (por ejemplo toxina de cólera o sus derivados); *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 de vaculolación de ureasa, catalasa,); *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 de tétanos y sus derivados), *C. botulinum* (por ejemplo toxina botulínica y sus derivados), *C. difficile* (por ejemplo toxinas de clostridium A o B y sus derivados); *Bacillus spp*, incluyendo *B. anthracis* (por ejemplo toxina botulínica y sus derivados); *Corynebacterium spp*, incluyendo *C. diphtheriae* (por ejemplo toxina de difteria y sus derivados); *Borrelia spp*, incluyendo *B. burgdorferi* (por ejemplo *OspA*, *OspC*, *DspA*, *DspB*), *B. garinii* (por ejemplo *OspA*, *OspC*, *DspA*, *DspB*), *B. afzelii* (por ejemplo *OspA*, *OspC*, *DspA*, *DspB*), *B. andersonii* (por ejemplo *OspA*, *OspC*, *DspA*, *DspB*), *B. hermsii*; *Ehrlichia spp*, incluyendo

5 *E. equi* y el agente la eritrocitosis Granulocítica Humana; *Rickettsia spp.*, incluyendo *R. rickettsii*; *Chlamydia spp.*, incluyendo *C. trachomatis* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. pneumoniae* (por ejemplo MOMP, proteínas de unión a heparina), *C. psittaci*; *Leptospira spp.*, incluyendo *L. interrogans*; *Treponema spp.*, incluyendo *T. pallidum* (por ejemplo las proteínas de membrana externas raras), *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*; *Trypanosoma spp.*, incluyendo *T. cruzi*; *Giardia spp.*, incluyendo *G. lamblia*; *Leishmania spp.*, incluyendo *L. major*; *Pneumocystis spp.*, incluyendo *P. carinii*; *Trichomonas spp.*, incluyendo *T. vaginalis*; *Schistosoma spp.*, incluyendo *S. mansoni*, o derivados de levaduras tales como *Candida spp.*, incluyendo *C. albicans*; *Cryptococcus spp.*, incluyendo *C. neoformans*.

10 Otras vacunas bacterianas preferidas comprenden antígenos derivados de *Haemophilus spp.*, incluyendo *H. influenzae* tipo B (por ejemplo PRP y sus conjugados), *H. influenzae* que no se pueden tipificar por ejemplo OMP26, adhesinas de alto peso molecular, P5, P6, proteína D y lipoproteína D, y fimbria y péptidos derivados de fimbria (documento US 5.843.464).

15 Los dispositivos revestidos de vacuna de ADN se pueden usar para la vacunación profiláctica o terapéutica y para cavar y/o refuerzo de la respuesta inmune.

20 Una de las ventajas de la presente invención es la capacidad para formular de manera conjunta el agente de ADN conjuntamente con los agentes adicionales activos, una capacidad de que esta limitada con otros agentes farmacéuticos de ADN sólidos. Por ejemplo, la vacuna de ADN puede además comprender un agente para potenciar la incorporación 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

25 Por ejemplo, el medio de depósito farmacéutico sólido puede preferiblemente contener un agente de condensación de ADN por ejemplo espermidina o PEI (polietileneimina). 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 prevenir las reacciones químicas perjudiciales durante el procesamiento o almacenamiento tal como inhibidores de reacción de Maillard como aminoácidos.

30 35 Un agente adicional preferido para atraparse de manera conjunta dentro del medio de depósito con el ADN es un inhibidor de la ADNasa. Un ejemplo de un inhibidor de la ADNasa que se prefiere es ácido aurinticarboxílico (ATA, Glasspool-Malone, J. et al., (2000), Molecular Therapy 2: 140 - 146).

40 Además, las vacunas de ADN de la presente invención, también pueden de manera ventajosa incluir un adyuvante. Los adyuvantes adecuados para las vacunas de la presente invención comprenden los adyuvantes que son capaces de potenciar las respuestas de anticuerpo contra el inmunógeno de péptido IgE. Los adyuvantes se conocen bien en la técnica (Vaccine Design - The Subunit and Adjuvant Approach, 1995, Pharmaceutical Biotechnology, Volume 6, Eds. Powell, M.F., y Newman, M.J., Plenum Press, New York y London, ISBN 0-306-44867-X). Los adyuvantes adecuados para las vacunas de la presente invención comprenden los adyuvantes que son capaces de potenciar las respuestas de anticuerpo contra el inmunógeno. Los agentes inmunoestimuladores adecuados incluyen, pero esta lista no significa que sea exhaustiva y no excluye otros agentes: imidazoquinolinas sintéticas tal como imiquimod [S-26308, R-837], (Dockrell y Kinghorn, 2001, Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 48, 751 - 755; Harrison, et al. “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, et al. Adjuvant activites 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 manera constitutiva sobre célula que presenta antígeno y superficies de células T, tal como tucare-sol (Rhodes, J. et al. “Therapeutic potentiation of the immune system by costimulatory Schiff-base-forming drugs”, Nature 377: 71-75 (1995)), citoquina, quimioquina y moléculas coestimuladoras como o bien proteína o péptido, esto incluiría la citoquinas proinflamatorias 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 y IL- 18, inductores de Th2 tales como IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 y IL-13 y otra quimioquina y genes coestimuladores tales como MCP-1, MIP-1 alfa, MIP-1 beta, RANTES, TCA-3, CD80, CD86 y CD40L, otros ligandos de dirección inmunoestimuladores tales como CTLA-4 y L-selectina, proteínas estimulantes de apoptosis y péptidos tal como Fas, (49), adyuvantes basados en lípidos sintéticos, tal como vaxfectina, (Reyes et al., “Vaxfectin enhances antigen specific antibody titres and maintains Th1 type immune responses to plasmid DNA immunization”, Vaccine 19: 3778 - 3786) escualeno alfa-escualeno, alfa-tocoferol, polisorbato 80, DÓPC y colesterol, endotoxina, [LPS], Beutler, B., “Endotoxin, Toll-like receptor 4, and the afferent limb of innate immunity”, Current Opinion in Microbiology 3: 23 - 30 (2000); CpG oligo- y di- nucleótidos, Sato, Y. et al., “Inmunoestimulador DNA sequences necessary for effective intradermal gene immunization”, Science 273 (5273): 352 - 354 (1996). Hemmi, H. et al., “A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA”, Nature 408: 740 - 745, (2000) y otros ligandos potenciales que activan los receptores de tipo Toll para producir las citoquinas que inducen Th1, tales como lipoproteínas Micobacterianas sintéticas, proteína p19 Micobacteriana, peptidoglicano, ácido teitoico y lípido A.

65 60 Ciertos adyuvantes preferidos para inducir una respuesta predominantemente de tipo Th1 incluyen, por ejemplo, un derivado de Lípido A tal como monofosforil lípido A, o preferiblemente 3-de-O-aciado monofosforil lípido A. Los adyuvantes MPL® están disponibles de Corixa Corporation (Seattle, WA; véase, por ejemplo, Las patentes de Estados Unidos números 4.436.727; 4.877.611; 4.866.034 y 4.912.094). Los oligonucleótidos que contienen CpG (en

los que el dinucleótido CpG está no metilada) también inducen a de manera predominante la respuesta de Th1. tales oligonucleótidos se conocen bien y se describen, por ejemplo, en los documentos WO 96/02555, WO 99/33488 y Patentes de Estados Unidos Números 6.008.200 y 5.856.462. Las secuencias de ADN inmunoestimuladoras también se describen por ejemplo, por Sato *et al.*, *Science* 273: 352, 1996. Otro adyuvante preferido comprende una saponina, 5 tal como Quil A, o sus derivados, incluyendo QS21 y QS7 (Aquila Biopharmaceuticals Inc., Framingham, MA); Escina; Digitonina; o Gipsofila o saponinas de *Chenopodium quinoa*.

En este aspecto de la presente invención el agente inmunoestimulador o adyuvante preferido es immiquimod u otras moléculas relacionadas (tal como resiquimod) como se describe en el número de publicación de solicitud de 10 patente PCT WO 94/17043 (cuyos contenidos se incorporan en el presente documento por referencia).

En una realización de la invención, se administra/distribuye un polinucleótido como ADN “desnudo”, por ejemplo como se describe en Ulmer *et al.*, *Science* 259:1745 - 1749, 1993 y se revisa por Cohen, *Science* 259: 1691 - 1692, 15 1993. la entrada de ADN desnudo se puede incrementar mediante revestimiento del ADN sobre perlas de microperlas pequeñas, tales como oro, o perlas biodegradables, que se transportan de manera eficaz en las células; o mediante el uso de otros agentes que facilitan la transfección, tales como Fosfato de Calcio o DEAE dextrano.

El ADN también se administra junto con un vehículo tal como, por ejemplo, liposomas, y estando todo atrapado en el medio de depósito. Típicamente tales liposomas son catiónicos, por ejemplo derivados de imidazolio (documento 20 WO 95/14380), derivados de guanidina (documento WO 95/14381), derivados de fosfatidil colina (documento WO 95/35301), derivados de piperazina (documento WO 95/14651) y derivados de biguanida.

Los ejemplos de excipientes farmacéuticamente aceptables incluyen, solución salina tamponada con fosfato, soluciones de tampón isotónicas.

25 Es una intención de la presente invención administrar agente o vacuna en la piel rápidamente y con alto rendimiento de administración. Esto se puede incluso potenciar adicionalmente mediante numerosos medios, que comprenden el uso de carbohidratos altamente solubles como el medio de depósito, y también mediante la agitación y/o calentamiento del miembro de microaguja durante la administración.

30 La cantidad de ADN que se puede expresar en cada dosis de vacuna se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos secundarios adversos significativos en las vacunas típicas. Tal cantidad variará dependiendo de las construcciones de de ADN específicas empleadas, sin embargo, se espera que cada dosis comprenderá 1 - 1000 μ g de ADN, preferiblemente 1 - 500 μ g, más preferiblemente 1 - 100 μ g, del cual 1 a 50 μ g es el 35 intervalo más preferido. Una cantidad optima para una vacuna particular se puede determinar mediante estudios convencionales que implican la observación de respuestas inmunes apropiadas en los sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o varias inmunizaciones de refuerzo espaciadas de manera adecuada.

40 Las formulaciones de la presente invención se pueden usar para tanto propósitos profilácticos como terapéuticos. De acuerdo con lo anterior, la presente invención proporciona un procedimiento de tratamiento de un mamífero susceptible de o que padece una enfermedad infecciosa o cáncer, o alergia, o enfermedad autoinmune. En un aspecto adicional de la presente invención se proporciona una vacuna como se describe en el presente documento para uso en medicina. La preparación de vacunas se describe en general en *New Trends and Developments in Vaccines*, editado por Voller *et al.*, University Park Press, Baltimore, Maryland, Estados Unidos 1978.

45 La presente invención se ejemplifica, pero sin limitación a, los siguientes ejemplos.

Ejemplo 1

50 *Demostración de revestimiento de agujas con ADN de plásmido liofilizado*

1.1 Preparación y formulaciones de plásmido

55 Los plásmidos usados en este estudio se muestran todos en la Figura 1. pEGFP-C1 es un vector de expresión de GFP, (Clontech, Palo Alto, California, Estados Unidos). pGL3CMV es un vector de expresión de luciferasa basado en pGL3 Basic, (Promega Corporation., Madison, Wisconsin, Estados Unidos), donde el promotor temprano inmediato de CMV dirige la expresión de la luciferasa. pVAC1.ova es un plásmido de expresión de ovoalbúmina de pollo, construido mediante ligación de ADNc ampliado por la PCR que codifica la ovoalbúmina de pollo a partir de pUGOVA, en el vector de expresión pVAC1. pVAC1 es una modificación del vector de expresión mamíferos, pCI, (Promega), donde el sitio de clonación múltiple, de EcoRI a Bst ZI, se ha reemplazado por la secuencia EMCV IRES flanqueada en 5' por únicos Nhe I, Rsr II y Xho I y 3' por los sitios de enzima de restricción Pac I, Asc I y Not I, amplificados a partir de pGL3Basic, (Promega). ADN de plásmido superenrollado, (baja endotoxina), se purificó a gran escala, aproximadamente 100 mg de rendimiento, a alta pureza usando una combinación de lisis de SDS alcalina, ultrafiltración y 60 cromatografía de columna de intercambio iónico.

65 Los plásmidos se volvieron a suspender en TE, (10 mM de TrisHCl, 1mM de EDTA), pH 8,0 a 1 ug/ul. y se determinó como > 95% superenrollado después de análisis por electroforesis de gel de agarosa.

Se formularon los plásmidos en una diversidad de soluciones, para revestimiento de agujas, mediante un procedimiento de precipitación con etanol a gran escala convencional. El ADN precipitado se volvió a suspender directamente en las soluciones de formulación acuosa a concentración de 0,5 a 12 ug/ul, (Véase el capítulo 1, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Sambrook, J. et al., 2^a Edición, 1989, CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, Estados Unidos).

1.2 Agujas y procedimientos de revestimiento

10 Agujas de coser de tamaño 8, (A817, Miliners, Milward, Coats Crafts, Reino Unido), se obtuvieron a partir de la asociación comercial John Lewis, PLC, (Londres, Reino Unido.). Las agujas hipodérmicas, Microlance 3, 30G, 26G, 25G y 21G were se obtuvieron de Becton and Dickinson, (New Jersey, Estados Unidos).

15 Las agujas de coser se revistieron sumergiendo una vez durante 30 a 60 segundos en 1,5 ml de formulación de plásmido, la aguja se suspendió del tapón de caucho de un vial de liofilización de vidrio de 2 ml, de manera que 1,0 a 1,5 cm de la aguja de coser se revistió. Se revistieron de manera similar agujas hipodérmicas manteniéndose manualmente en el lugar con una jeringa de 1 ml para equilibrar en formulaciones de plásmido de 1,5 ml en tubos tapados con rosca de plástico de 2 ml, Sarstedt, (Numbrecht, Alemania).

20 Las agujas tratadas con ácido se sumergieron durante 5 segundos en ácido clorhídrico concentrado, (HCl), seguido de lavado con agua destilada y secando al aire sobre toallas de papel. Después se almacenaron las agujas en un vaso de precipitados de vidrio estéril y se sometió a un ciclo de autoclave único durante 20 minutos a 15 psi (103,42 kPa). Después las agujas se secaron en una campana de extracción de humos y se almacenaron a temperatura ambiente.

25 1.3 Liofilización y elución de ADN de plásmido

30 Se liofilizaron las agujas revestidas a vacío durante un mínimo de 1 hora a -45°C o menos usando un Modulyo 4K Freezer Dryer, (Edwards, Crawley, Reino Unido). Las agujas liofilizadas revestidas con ADN su usaron o bien inmediatamente o se almacenaron selladas a 4°C.

35 El ADN de plásmido se eluyó de las agujas revestidas mediante agitación durante 30 minutos en 0,5 ml de 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina, 2,9% de etanol en tubos tapados con rosca de plástico de 2 ml, Sarstedt, a temperatura ambiente. ADN de plásmido se recuperó después mediante precipitación con etanol convencional, (Sambrook, J. et al., *supra*), y se volvió a suspender en 20 a 30 ul of 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina, 2,9% de etanol para aplicación sobre geles de agarosa.

40 1.4 Electroforesis en gel de agarosa y “ensayo de liberación de aguja” en gel de agarosa

45 ADN de plásmido y que se eluye de las agujas después de revestimiento se ensayó de manera rutinaria sobre o bien 0,8% o 1,2% de geles E de agarosa que contenía bromuro de etidio de acuerdo con las instrucciones del fabricante, Invitrogen Corporation, (Carlsbad, California, Estados Unidos).

50 Para controlar el nivel de liberación de ADN de plásmido de agujas revestidas directamente en geles de agarosa, 2,5 cm de espesor, 1% de agarosa, (Ultra Pure, Life Technologies, Paisley, Escocia, Reino Unido), se vertieron los geles. Se insertaron las agujas en la agarosa justo detrás del pocillo para permitir la liberación del ADN de plásmido de la aguja en la agarosa. La electroforesis en gel se realizó después sin bromuro de etidio u otros agentes de visualización de ADN a 100 V, 100 mA durante 1 a 2 horas, (véase el Capítulo 6 en Sambrook, J. et al., *supra*). Después se visualizó el ADN mediante tinción con SYBR Gold, de acuerdo con las instrucciones del fabricante, (Molecular Probes, Eugene, Oregon, Estados Unidos.). Se realizó análisis de gel usando el paquete Visionworks sobre el sistema de análisis de gel UVP8000, (UVP Life Sciences, Cambridge, Reino Unido.).

55 1.5 Revestimiento de agujas de coser con altas concentraciones de ADN en solución acuosa que contiene agentes de estabilización

60 Los experimentos iniciales para investigar la viabilidad de superficies afiladas de revestimientos con ADN de plásmido de la solución se realizaron sobre agujas de coser tratadas con ácido. Las agujas de coser de tamaño 8 durante 2 - 3 horas en soluciones de ADN de plásmido que varían entre 0,5 ug/ul y 5 ug/ul preparadas o bien e agua o 0,85% de solución salina. Se retiraron las agujas cuidadosamente y se liofilizaron y se almacenaron después a 4°C, selladas durante 60 horas antes de que se fluyera el ADN, mediante agitación vigorosa en 500 ul de TE durante 30 min. Se concentró el ADN mediante precipitación con etanol y se analizó mediante electroforesis de gel. ADN, < 100 ng, degradado parcialmente, se recuperó de la muestra de 5 ug/ul de solución salina. Ninguna otra muestra mostró ADN a detectar sobre un gel de agarosa, (datos no mostrados). Se pensó del mismo modo que el procedimiento de tratamiento de ácido generaba una combinación de iones metálicos ferrosos y férricos que afectaban de manera adversa a corto plazo a la estabilidad del ADN de plásmido, (Evans et al. *Supra*; documento WO 97/40839).

Para mejorar el procedimiento de revestimiento de aguja y reducir el plásmido de degradación de ADN se formuló en solución acuosa en la presencia de numerosos compuestos químicos, (por ejemplo, quelantes e inactivadores de radicales libres), mostró incrementar la estabilidad del plásmido en la presencia de iones metálicos, (Evans *et al. Supra*; documento WO 97/40839). Se limpiaron también las agujas de coser con metanol y se secaron al aire para reducir la formación de iones metálicos. Soluciones de ADN de plásmido se prepararon a una concentración muy alta 5 ug/ul o 10 ug/ul en 100 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina, 2,9% de etanol pH 8,0, (formulación 2). Se revistieron agujas de coser de tamaño 8 con ADN sumergiendo en solución durante toda la noche a 4°C, una vez y se retiraron cuidadosamente las agujas y se liofilizaron y después se eluyó inmediatamente el ADN, se concentró y se analizó mediante electroforesis de gel.

10 Los datos de tal análisis se muestran en la Figura 2, donde se compara el revestimiento de agujas tratadas con ácido y lavadas con metanol.

15 Los grupos ensayados se desarrollaron en calles:

15 1) 1 ug de escalera de ADN de 1 kb, (Promega). 2) plásmido pEGFP-C1 eluido de una solución madre de 5 ug/ul revestido sobre agujas de coser tratadas con HCl. 3) plásmido pEGFP-C1 eluido de una solución madre de 10 ug/ul revestido sobre agujas de coser tratadas con HC. 4) plásmido pEGFP-C1 eluido de una solución madre de 5 ug/ul revestido sobre agujas de coser lavadas con metanol. 5) plásmido pEGFPC1 eluido de una solución madre de 10 ug/ul revestido sobre agujas de coser lavadas con metanol. 6) patrón de plásmido pEGFP-C1 - 0,5 ug. 7) patrón de plásmido pEGFP-C1 - 1,0 ug, 8) patrón de plásmido pEGFP-C1 - 5,0 ug, 9) patrón de plásmido pEGFP-C1 -10,0 ug.

20 En la ausencia de un exceso de iones metálicos generados por tratamiento de ácido, ADN no degradado, 1 - 2 ug, se recuperó de la muestra de 5 ug/ul mientras que la muestra de 10 ug/ul produjo \geq 10 ug. Esto estableció el principio que el ADN se podría revestir y liofilizar sobre objetos afilados de tales como agujas de coser y se eluyó mayormente intacto.

Ejemplo 2

30 *Estabilidad de altas concentraciones de plásmido después de revestir sobre las agujas*

35 Se investigó después la reproducibilidad de revestimiento de aguja y estabilidad a corto plazo del ADN de plásmido liofilizado almacenado a 4°C sobre agujas. Soluciones de ADN de plásmido de 5 ug/ul o 10 ug/ul en 100 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina, 2,9% de etanol pH 8,0, (formulación 2), se revistieron sobre agujas de coser de tamaño 8, se liofilizaron y el ADN o bien se eluyó inmediatamente o se almacenó a 4°C durante 1 - 4 días. Los datos de tal análisis se muestran en la Figura 3, donde se muestran agujas duplicadas, almacenadas para cada momento:

- 40 (A) plásmido pEGFP-C1 eluido de una solución madre de 5 ug/ul revestido sobre agujas de coser lavadas con metanol.
- 45 (B) plásmido pEGFP-C1 eluido de una solución madre de 10 ug/ul revestido sobre agujas de coser lavadas con metanol. En cada gel las calles representan: 1) patrón de plásmido pEGFP-C1 - 5,0 ug (A), 10,0 ug (B). 2) 1 ug de escalera de ADN de 1 kb, (Promega). 3) y 4) Elución inmediata después de revestimiento. 5) y 6) Elución después de almacenamiento sobre agujas de coser a 4°C durante 16 horas. 7) y 8) Elución después de almacenamiento sobre agujas de coser a 4°C durante 40 horas. 9) y 10) Elución después de almacenamiento sobre agujas de coser a 4°C durante 64 horas. 11) y 12) Elución después de almacenamiento sobre agujas de coser a 4°C durante 88 horas.

50 Grandes cantidades de plásmido, hasta 5 ug, se pueden retener mayormente intactas sobre agujas revestidas liofilizadas y se eluyeron después de 66 a 88 horas de almacenamiento a 4°C. Sin embargo, revestimiento, elución o almacenamiento se encontró que era algo variable, mostrando la muestra de 10 ug/ul la menor varianza. La conversión de ADN circular cerrada de manera covalente, (ccc), (banda de plásmido de fondo, Fig. 3) a circular abierto, (oc), (banda de plásmido superior, Fig. 3), parecía producirse con el tiempo tras almacenamiento. Estas cuestiones se dirigieron con formulaciones mejoradas adicionales.

Ejemplo 3

60 *Estabilidad a corto plazo mejorada de altas concentraciones de plásmido después de revestir sobre agujas*

65 Las formulaciones adicionales de plásmido, en 100 mM de Tris, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina, 2,9% de etanol pH 8,0, (formulación 2), pero con la presencia adicional de porcentajes de azúcares de un contenido en azúcar bajo (17,5%) "LS" o de alto contenido en azúcar (40%) "HS", o bien trehalosa o sacarosa, se evaluaron para revestimiento de aguja y estabilidad a corto plazo después de liofilización. Electroforesis en gel de agarosa de ADN eluido de tal análisis se muestra en la Figura 4. Las formulaciones que contienen 17,5% de sacarosa, (LS) o trehalosa, (LT), (ADN de plásmido a 5 ug/ul), o 40% de sacarosa, (HS, ADN de plásmido a 12 ug/ul) o trehalosa, (HT, ADN de plásmido a 5 ug/ul), se compararon para revestimiento de aguja, elución e integridad de ADN.

La Fig. 4 muestra:

- 5 (A) plásmido pGL3CMV eluido de la formulación (HS) o formulación (HT), revestido sobre agujas de coser lavadas con metanol.
- 10 (B) plásmido pGL3CMV eluido de las formulaciones (LS) o (LT), revestido sobre agujas de coser lavadas con metanol. Ilustrando las calles en cada diagrama: 1) 1 ug de escalera de ADN de 1 kb, (Promega). 2) elución inmediata después de revestimiento, HS: (A), LS: (B). 3) elución después de almacenamiento sobre agujas de coser a 4°C durante 16 horas, HS: (A), LS: (B). 4) elución después de almacenamiento sobre agujas de coser a 4°C durante 40 horas, HS: (A), LS: (B). 5) elución después de almacenamiento sobre agujas de coser a 4°C durante 64 horas, HS: (A), LS: (B). 6) elución inmediata después de revestimiento, HT: (A), LT: (B). 7) elución después de almacenamiento sobre agujas de coser a 4°C durante 16 horas, HT: (A), LT: (B). 8) elución después de almacenamiento sobre agujas de coser a 4°C durante 40 horas, HT: (A), LT: (B). 9) elución después de almacenamiento sobre agujas de coser a 4°C durante 64 horas, HT: (A), LT: (B).
- 15

La presencia de bajas y altas concentraciones de azúcares, particularmente las últimas, (véase la Fig 4a), reproducibilidad mejorada y estabilidad de ADN liofilizado revestido sobre agujas. No existía incremento obvio en la proporción de ADN circular abierto de plásmido tras almacenamiento durante 3 días a 4°C, en la presencia de azúcares y ADN de plásmido permanecía mayormente como formato ccc.

Ejemplo 4

25 *Liberación en geles de agarosa de altas concentraciones de plásmido de agujas revestidas*

Se realizaron experimentos para ver la velocidad de liberación o administración de ADN de plásmido liofilizado, de las formulaciones de alto contenido en azúcar, (HS, ejemplo 3), revestido sobre agujas de coser, tras la re-hidratación. ADN de plásmido de solución madre se volvió a suspender en 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina, 2,9% de etanol, (formulación 2), de manera adicional que contiene 40% de sacarosa, (HS), a 12 ug/ul o trehalosa, (HT), a 5 ug/ul para revestimiento de aguja. Se logró la liberación de ADN colocando las agujas, revestidas recientemente con ADN de plásmido liofilizado, en 1% de geles de agarosa, espesos justo por encima de los pocillos de gel, para incrementos crecientes de tiempo de 15 seg. a 15 min. y realizando electroforesis. Despues se tiñeron los geles con oro SYBR, el tinte de ADN más sensible disponible, (véase, la Fig. 5A). Cualquier plásmido restante se eluyó de las agujas después de “punción” en agarosa y se precipitó y se analizó en geles de agarosa teñidos con oro SYBR, como se ha indicado anteriormente, (véase, Fig. 5B). Los resultados, mostrados en la Figura 5, demostraron que la mayoría del ADN de plásmido, (> 90%), aproximadamente 10 ug, se liberó de las agujas en 1 a 2 min.

40 Fig 5:

- (A) plásmido liberado de agujas de coser revestidas después de la inserción inmediata un gel de agarosa durante períodos de tiempo crecientes.
- 45 (B) plásmido retenido y eluido de agujas de coser revestidas después de la inserción inmediata un gel de agarosa durante períodos de tiempo crecientes, (A).

representando cada calle:

50 1) 1 ug de escalera de ADN de 1 kb, (Promega). 2) Liberación en gel durante 15 segundos, (HT). 3) Liberación en gel durante 60 segundos, (HT). 4) Liberación en gel durante 2 minutos, (HT). 5) Liberación en gel durante 5 minutos, (HT). 6) Liberación en gel durante 15 minutos, (HT). 7) Empty, 8) Liberación en gel durante 15 segundos, (HS). 9) Liberación en gel durante 60 segundos, (HS). 10) Liberación en gel durante 2 minutos, (HS). 11) Liberación en gel durante 5 minutos, (HS). 12) Liberación en gel durante 15 minutos, (HS). 13) Vacío. 14) patrón de plásmido pGL3CMV - 0,5 ug. 15) patrón de plásmido pGL3CMV -1,0 ug, 16) patrón de plásmido pGL3CMV - 5,0 ug, 17) patrón de plásmido pGL3CMV - 12,0 ug.

Ejemplo 5

60 *Dosis mejorada de plásmido revestido sobre una única aguja hipodérmica comparado con una única aguja de coser*

Para incrementar la dosis de ADN de plásmido que se podría revestir y después liofilizar sobre una única aguja, se propuso la hipótesis de que una aguja hipodérmica hueca presentaría una mayor área de superficie y un ADN más acomodado que una aguja de coser sólida. Se revistieron agujas hipodérmicas 30G mediante el mismo ADN de plásmido/procedimiento de revestimiento de aguja, (usando la formulación HS, véase la Fig. 4b), junto con procedimientos de revestimiento idénticos para agujas de coser y la cantidad de plásmido eluido se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa. Se analizaron cinco agujas idénticas de cada tipo. Los resultados se muestran en la figura 6 para las

ES 2 322 572 T3

calles) 1 ug de escalera de ADN de 1 kb, (Promega), 2), 3), 4), 5) y 6) Plásmido pGL3CMV eluido de agujas de coser revestidas, lavadas con metanol, 7), 8), 9), 10 y 11) Plásmido pGL3CMV eluido de agujas hipodérmicas, 30G. 12) patrón de plásmido pGL3CMV - 5,0 ug.

5 El uso de agujas hipodérmicas 30G da como resultado al menos un incremento de dos veces en la cantidad de plásmido revestido sobre agujas de coser. Esto sugiere que sustancialmente se puede revestir más ADN sobre agujas huecas comparado con agujas sólidas.

10 Ejemplo 6

Formulaciones óptimas para la liberación de ADN de plásmido, después de revestimiento y liofilización, de agujas de coser e hipodérmicas

15 Una serie de diferentes formulaciones de ADN, que carece de un número de componentes individuales de la formulación completa de HS, (descrita en el Ejemplo 3), se compararon conjuntamente con las formulaciones completas de HS y LS, para determinar su capacidad de liberar ADN después de revestimiento y liofilización en agujas. Un intervalo de agujas: de tamaño 10 de coser e hipodérmica que varían entre 21G, 25G, 26G a 30G se compararon en este análisis. Se ensayó la liberación de ADN como se ha descrito en el Ejemplo 4, Fig. 5 mediante un “ensayo de 20 liberación en gel de agarosa”, el tiempo de liberación era aproximadamente 2 minutos, seguido de electroforesis de gel y tales datos se muestran en la Figura 7.

Las calles se perforaron con agujas revestidas con las siguientes formulaciones:

25 Fig 7A Fig 7B

Formulación y combinaciones de aguja

30 Calle:

1) A1	F1
2) A2	Vacío
3) A3	F2
4) A4	Vacío
5) A5	F3
6) Vacío	Vacío
7) B1	F4
8) B2	Vacío
9) B3	F5

50

55

60

65

ES 2 322 572 T3

5	10) B4	Vacio
	11) B5	G1
10	12) Vacío	Vacio
	13) C1	G2
15	14) C2	Vacio
	15) C3	G3
	16) C4	Vacio
	17) C5	G4
20	18) Vacío	Vacio
	19) D1	G5
	20) D2	Vacio
	21) D3	H1
	22) D4	Vacio
25	23) D5	H2
	24) Vacío	Vacio
	25) E1	H3
30	26) E2	Vacio
	27) E3	H4
	28) E4	Vacio
35	29) E5	H5
	30) Vacío	Vacio
	31) Vacío	I1
40	32) Vacío	Vacio
	33) Vacío	I2
	34) Vacío	Vacio
45	35) Vacío	I3
	36) Vacío	Vacio
	37) Vacío	I4
50	38) Vacío	Vacio
	39) Vacío	I5
55	40 - 45) Vacío	Vacio
	46) patrón de plásmido pVaclova - 0,5 ug.	pVaclova - 0.5ug
	47) Vacío	Vacio
60	48) patrón de plásmido pVaclova - 5,0 ug	patrón de plásmido pVaclova - 5,0 ug
	49) Vacío	Vacio

ES 2 322 572 T3

Formulación y combinaciones de aguja

Calle

5 50) 1 ug de escalera de ADN de 1 kb, (Promega). 1 ug de escalera de ADN de 1 kb, (Promega).

Usando las formulaciones descritas el siguiente código:

- 10 A) 40% de sacarosa, 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina, 2,9% de etanol, (HS),
- 15 B) 17,5% de sacarosa, 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina, 2,9% de etanol, (LS),
- 20 C) 40% de sacarosa, 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 2,9% de etanol, (HS - metionina),
- D) 40% de sacarosa, 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina, (HS - etanol),
- E) 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina, 2,9% de etanol, (formulación 2),
- 25 F) 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 2,9% de etanol, (formulación 2 - metionina),
- G) 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina, (formulación 2 - etanol),
- H) 40% de sacarosa en agua,
- 30 I) 10 mM de Tris/HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA,
- 1 - Agujas de coser, tamaño 8,
- 35 2 - agujas hipodérmicas 30G
- 3 - agujas hipodérmicas 26G,
- 4 - agujas hipodérmicas 25G,
- 5 - agujas hipodérmicas 21G.

40 Los datos sugieren que las realizaciones preferidas para la liberación óptima de ADN en este ensayo son las que contienen sacarosa, (o bien al 17,5%, o 40%) o una formulación completa de quelantes e inactivadores de radicales libres, (formulación 2) o más preferiblemente una combinación de ambos. Los datos también demuestran que la liberación de ADN en este ensayo, para la mayoría de las formulaciones ensayadas, era mejor usando las agujas de coser y agujas hipodérmicas se tamaño de hueco mayor que 26G, (26G óptimo), siendo las agujas hipodérmicas 30G más deficientes para la liberación de ADN en este ensayo.

Ejemplo 7

50 Las formulaciones óptimas para estabilizar el ADN de plásmido después de revestimiento, liofilización y almacenamiento sobre agujas

55 La serie de formulaciones de ADN diferentes, que carece de un número de componentes individuales de la formulación completa de HS, (Ejemplo 3), como se describe en el Ejemplo 6 y Fig. 7, se compararon para determinar su capacidad para estabilizar el ADN de plásmido superenrollado, después de revestimiento y liofilización en agujas, tras almacenamiento a corto plazo. Agujas de coser, lavadas con metanol, se revistieron, se liofilizaron y se almacenaron a 4°C durante 7 días. ADN de plásmido después se eluyó y se recuperó de la manera convencional y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, (100 V, 100 mA durante 2 horas), en la ausencia de agentes de intercalación, (Sambrook, J. et al., *supra*). La integridad del ADN de plásmido eluido se controló después de tinción con oro SYBR y visualización en luz UV. Tales datos se muestran en la Fig. 8, que muestra ADN de plásmido de agujas de coser lavadas con metanol y almacenamiento que se formularon en una diversidad de formulaciones diferentes, A - I, como se describe en el Ejemplo 6.

Calles:

- 1) 1 ug de escalera de ADN de 1 kb, (Promega).
- 5 2) patrón de plásmido pVaclova - 5,0 ug
- 3) y (4) Formulación A, (pérdida de muestra - calle 3)
- 10 5) y (6) Formulación B
- 7) y (8) Formulación C
- 9) y (10) Formulación D
- 15 11) y (12) Formulación E
- 13) y (14) Formulación F
- 15) y (16) Formulación G
- 20 17) y (18) Formulación H
- 19) y (20) Formulación I

25 Los datos confirman que las formulaciones que contiene una combinación de azúcar con agentes quelantes e inhibidores de radicales libres general la producción mayor y más reproducible de ADN de plásmido cuando se eluye de agujas. Los datos sugieren que el ADN de plásmido se mantiene predominantemente para liberación en la forma monomérica superenrollada solamente en las formulaciones que contienen una combinación de azúcar con agentes de quelación e inhibidores de radicales libres.

Ejemplo 8

35 *Demostración de administración in vivo de ADN de plásmido funcionalmente activo a partir de agujas revestidas, liofilizadas*

Administración in vivo y ensayos de luciferasa

40 La administración de ADN de plásmido de agujas revestidas se realizó en ratones hembras Balb/c x C3H F1 tanto por vía intramuscular, (IM), como por vía intradérmica, (ID). Para la administración IM una aguja hipodérmica 30G revestida de ADN se insertó en un músculo de fémur afeitado previamente durante 10 a 20 segundos antes de la retirada. Para la administración ID los ratones se anestesiaron con isofluorano y se insertó una aguja hipotérmica 30G en un área afeitada previamente de abdomen bajo microscopía baja en polvo durante 2 minutos. Como controles positivos, 10 μ g de ADN de plásmido en solución salina se inyectó mediante un procedimiento convencional tanto IM como ID. Grupos de 10 animales o tejidos se analizaron contra seis controles positivos. Se sacrificaron los ratones y se retiraron muestras 48 horas después de la administración de plásmido y se congelaron de manera rápida en nitrógeno líquido.

50 Muestras de músculo o piel se descongelaron a temperatura ambiente y se rompieron en 500 μ l de tampón de lisis pasivo, (Promega Corporation, Madison, Wisconsin, Estados Unidos), usando un politrón IKA Labortechnic Ultra turrax T8. Se determinó la actividad de la luciferasa usando un kit de ensayo de luciferasa, (Promega). 40 μ l del lisado (por duplicado) se ensayó conjuntamente con 200 μ l de reactivo de ensayo de luciferasa (Promega) en una placa de 96 posillos negra, (Nunc). La actividad de la luciferasa (RLU) se midió como cuentas por segundo en un contador de 55 centelleo y luminiscencia TopCountNXT HTS, (Packard). La concentración de proteína total se calculó mediante el kit de reactivo de ensayo de proteína Coomassie Plus (Pierce) usando el protocolo del fabricante. En resumen, 5 μ l de lisado de células se ensayó conjuntamente con 145 μ l de agua (Sigma) y 150 μ l de reactivo de azul coomasie en placas de fondo redondo de 96 pocillos (Costar). Se midió la absorbancia a 595 nm sobre un Molecular Devices Spectra Max 340. La actividad de la luciferasa se expresó como unidades de luz relativas (RLU)/mg de proteína.

60 Los datos de tal experimento se muestran en la Figura 9, donde se compara la actividad de la luciferasa derivada del plásmido "liberado de agujas revestidas" con la derivada del plásmido administrado mediante inyecciones IM convencional, (Fig. 9A), y ID, (Fig. 9B). Los datos sugieren que al menos 1/10 ratones eran positivos para actividad de la luciferasa después de la liberación de ADN ID de administración por aguja revestida y al menos 3/10 ratones eran positivos después del procedimiento IM similar. Esto demuestra el principio que el ADN de plásmido se puede liberar de estas formulaciones cuando se reviste sobre agujas en una forma transcripcionalmente activa para permitir la expresión de un gen o antígeno codificado.

Ejemplo 9

5 *Demostración que la administración *in vivo* de ADN de plásmido por vía intradérmica (ID), a partir de agujas revestidas, liofilizadas puede mostrar una eficacia similar de la expresión génica a la inyección de ADN de plásmido líquido*

*Administración *in vivo* y ensayos de luciferasa*

10 Esto se realizó como se describe en el Ejemplo 8 para la administración ID a la piel de ratón. Como en el ejemplo 8, todas las formulaciones de ADN salvo que se establezca otra cosa, usadas para la administración génica *in vivo*, contenía ADN de plásmido pGL3CMV a 10 mg/ml y 40% de sacarosa, 100 mM de Tris/HCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina y 2,9% de etanol, y se revistieron sobre agujas de coser mediante liofilización como se ha descrito previamente.

15 Los datos de un experimento, donde la actividad de la luciferasa derivada del plásmido “liberado de agujas revestidas”, (o bien agujas hipodérmicas 30G o de coser), se compara con la derivada de plásmido administrado mediante inyección ID convencional se muestran en la Figura 10. Los datos sugieren que al menos 5/9 ratones eran positivos para la actividad de la luciferasa después de la liberación de ADN ID de inyección de aguja hipodérmica y al menos 6/9 ratones eran positivos para la actividad de la luciferasa después de la liberación de ADN ID de inyección de aguja 20 de coser. Los niveles de expresión génica en animales individuales son en general comparables con, o mayores que, los animales a los que se habían administrado 10 μ g de ADN de plásmido mediante inyección ID.

Ejemplo 10

25 *Demostración que la administración *in vivo* de ADN de plásmido funcionalmente activo a partir de agujas revestidas, liofilizadas se puede potenciar por electroporación*

*Administración *in vivo* y ensayos de luciferasa*

30 Esto se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 8 para la administración ID y IM a la piel de ratón, excepto que para tanto la administración ID como IM, dos agujas de coser se insertaron de manera simultánea para permitir la liberación de ADN y las agujas permanecieron en el tejido durante 2 minutos en ambos casos.

35 La electroporación se realizó después de 2 minutos de administración de ADN, usando un dispositivo de electroporación de ondas cuadrado BTX 830, (BTX, California, Estados Unidos), usando electrodos de disposición de 2 agujas separadas 5 mm que se han revestido de manera similar con ADN de plásmido/formulaciones de sacarosa más excipientes.

40 Para el experimento de administración ID mostrado en la Figura 11A, las condiciones de electroporación eran: 875 voltios, 3 pulsos de 100 microsegundos seguido de la polaridad inversa y 3 pulsos de 100 microsegundos con un retardo entre pulsos de 125 milisegundos, (Glasspool- Malone, J. *et al.*, (2000), Molecular Therapy 2: 140 - 146). Los datos se presentan como una media de 9 animales, 3 en el caso de agujas no revestidas, como la actividad de la luciferasa en cuentas por segundo, (CPS)/mg de proteína. En este experimento los 9 animales donde la actividad 45 de la luciferasa derivada de plásmido, liberado a partir de agujas revestidas, eran positivos para la expresión génica como lo eran los 9 animales donde la actividad de la luciferasa derivado de plásmido, liberado de los electrodos revestidos, y reforzados por electroporación, (datos no mostrados). Los datos sugieren que la electroporación refuerza el nivel de la expresión génica a partir de la administración por aguja revestida ID una media de 2 a 3 veces en estas condiciones.

50 Para el experimento de administración IM mostrado en la Figura 11B, las condiciones de electroporación eran: 900 voltios, 3 pulsos de 100 microsegundos seguido de polaridad inversa y 3 pulsos de 100 microsegundos con un retardo entre pulsos de 1 segundo, (Vicat, J., *et al.*, (2000), Human Gene Therapy 11: 909 - 916). Los datos se presentan como una media de 9 animales, 3 en el caso de agujas no revestidas, como la actividad de la luciferasa en unidades 55 relativas de luz, (RLU)/mg de proteína. En este experimento 1/9 animales donde la actividad de la luciferasa derivada de plásmido, liberado de agujas revestidas, eran positivos para la expresión génica mientras que 6/9 animales donde la actividad de la luciferasa derivada de plásmido, liberado de electrodos revestidos, y reforzados con electroporación eran positivos para la expresión génica, (datos no mostrados). Los datos sugieren que la electroporación refuerza el nivel de expresión génica a partir de la administración por aguja revestida IM una media de aproximadamente 5 60 veces en estas condiciones. También se sugiere que la electroporación puede aumentar el número de animales que son positivos para la expresión génica de animales que son positivos para la expresión génica derivada de la liberación de plásmido a partir de agujas o electrodos revestidos.

Ejemplo 11

Demostración de la administración in vivo de ADN de plásmido funcionalmente activo a partir de agujas revestidas, liofilizadas y electroporación

5 *Administración in vivo y ensayos de luciferasa*

Esto se realizó como se ha descrito en el Ejemplo 8 para la administración ID a piel de ratón, pero con las siguientes modificaciones.

10 Las microagujas de silicio fuera del plano de la oblea huecas en forma de cruz con aberturas en el filo se fabricaron mediante un procedimiento grabado de ion reactivo profundo (DRIE), (Griss, P. y Stemme, G., "Side-Opened Out-of-Plane Microneedles for Microfluidic Transdermal Liquid Transfer", (2002), en "Micromachined Interfaces for Medical y Biochemical Applications", PHD Thesis, Griss, P., Royal Institute of Technology, Estocolmo, Suecia).

15 Los parámetros de Microagujas eran para microprocesadores de silicio cuadrados de 5 mm x 5 mm con una disposición equidistante de 100 microagujas, como 10 por 10. Las microagujas individuales eran de 240 - 250 micrones de longitud. Los microprocesadores de silicio cuadrados de 5 mm x 5 mm se fijaron centralmente sobre placas de sostenimiento cuadradas de 1 cm para permitir la aplicación a la piel. Los microprocesadores de silicio se revistieron derramando 10 μ l de ADN/azúcar/formulación de excipientes, sobre la superficie de la microaguja con una pipeta

20 Gilson, y liofilizando la microaguja revestida, como se ha descrito previamente. Estos se colocaron sobre la piel de ratones Balb/c afeitados previamente, en la espada inferior por encima de la base de la cola. La piel de ratón se había hidrata previamente en esta región mediante la aplicación de 5 μ l de solución salina tamponada con fosfato al sitio de aplicación de la microaguja.

25 Los ratones se mantuvieron en condiciones de anestesia general usando una máscara de isofluorano inhalado controlado por oxígeno y se les proporcionó Rimadyl, (Carprofen), como un analgésico a dosis subcutánea de 5 mg/Kg, (distribuido en 20 μ l/ratón), mientras estaban en anestesia general pero antes de la aplicación de microaguja.

30 La electroporación se realizó después de 2 minutos de la administración de ADN, usando un dispositivo de electroporación de ondas cuadrado BTX 830, (BTX, California, Estados Unidos), usando un electrodo de calibre cuadrado de 1 cm separado por 1 mm, en el pliegue de la piel afeitada donde se había aplicado la microaguja. Los parámetros usados eran 75 voltios, 3 pulsos de 20 milisegundos con un retraso entre pulsos de 100 milisegundos, (Zhang, L *et al.*, (2002), *Biochim. Biophys. Acta* 1572: 1 - 9).

35 Los datos de un experimento, donde la actividad de la luciferasa derivada de plásmido "liberado de microagujas revestidas" reforzada con electroporación, (Micro + elec), se muestra en la Fig 12. En este experimento 4/7 animales eran positivos para la expresión génica y muestran actividad de la luciferasa derivada de plásmido, liberado de microagujas revestidas, después de la electroporación y demostrar que esto puede actuar como un sistema de distribución génica a la piel.

40

Ejemplo 12

45 *Estabilidad de ADN de plásmido, en diferentes formulaciones de azúcar; después de revestimiento, liofilización y almacenado sobre agujas, a 37°C*

Se llevó a cabo un procedimiento similar al descrito en el Ejemplo 7 para comparar la estabilidad del ADN de plásmido de una serie de formulaciones diferentes de ADN donde se varió o bien la cantidad de sacarosa o el tipo de azúcar usado en la formulación. Todos los otros excipientes previamente descritos como óptimos para la estabilidad 50 de ADN y liberación permanecieron presentes en todas las formulaciones, (es decir, 100 mM de TrisHCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina y 2,9% de etanol). Las formulaciones se compararon para determinar su capacidad de estabilizar el ADN de plásmido superenrollado, después de revestimiento y liofilización en agujas, tras almacenamiento durante hasta un mes a 37°C, (estudio de estabilidad de ADN acelerada). Despues se eluyó el ADN de plásmido y se recuperó de la manera habitual y se sometió a electroforesis en gel de agarosa, (100 V, 100 mA durante 2 55 horas), en la ausencia de agentes intercalantes, (Sambrook, J. *et al.*, *supra*). Despues se controló la integridad del ADN de plásmido eluido después de la tinción con bromuro de etidio y visualización bajo luz UV. El porcentaje de formas de plásmido monoméricas y diméricas superenrolladas y formas circulares lineales y abiertas de estas muestras se midieron como intensidad de imagen usando el software de análisis de imagen Labworks 4.0 sobre el sistema UVP Bioimaging.

60

Los datos se muestran en la Fig 13, en forma de una representación gráfica del plásmido superenrollado, (%ccc), formas de plásmido tanto monoméricas, (%cccmon), como diméricas, (%cccdim); después de revestimiento y liofilización sobre agujas de coser y almacenamiento a 37°C. Las formulaciones de plásmido usadas contienen cantidades variables de azúcares: Fig 13A: 5% de sacarosa, Fig 13B: 10% de sacarosa, Fig 13C: 17,5% de sacarosa, Fig 13D: 65 40% de sacarosa, Fig 13E: 40% trehalosa, Fig 13F: 40% de glucosa.

Los datos sugieren que todas las formulaciones que contienen azúcares mantienen un alto grado de estabilidad de plásmido, incluso después de almacenamiento a 37°C durante gasta un mes, mayor que 80% y hasta 98% del plásmi-

do permanece en una forma superenrrollada. Para las formulaciones que contienen niveles de azúcar de 40%, (p/v), el equilibrio entre las formas de plásmido monoméricas y diméricas permanece relativamente constante, predominando la forma monomérica preferida en las formulaciones de azúcar que varían entre trehalosa a sacarosa a glucosa, (Figs 13D, 13E y 13F). Para las formulaciones que contienen bajas concentraciones de sacarosa, la forma dimérica tiende a predominar sobre el monómero, especialmente tras almacenamiento prolongado a 37°C, (Figs 13A, 13B y 13C). En general los datos son consistentes con el más alto nivel de azúcar presente en la formulación que conduce a una mayor estabilidad de ADN de plásmido.

10 Ejemplo 13

Demostración de formación de vidrio amorfo después de liofilización de ADN de plásmido, en formulaciones de sacarosa que contienen excipientes

15 *Ánálisis de formulaciones de ADN de plásmido liofilizado, mediante calorimetría de barrido diferencial, (DSC)*

Muestras de ADN liofilizado/formulaciones de sacarosa se prepararon conteniendo ADN de plásmido, (10 mg/ml) en 40% de sacarosa y también se prepararon muestras liofilizadas que contenían de manera adicional 100 mM de TrisHCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina y 2,9% de etanol. Se dividieron las muestras y se sometieron a ciclos de liofilización o bien de 1 hora o de 24 horas. Después las muestras se sometieron a análisis mediante calorimetría de barrido diferencial, (DSC), para determinar la forma de estado sólido. Esto se realizó sobre una máquina de TA Instruments DSC2920 a un intervalo de temperatura entre 25°C y 300°C, usando nitrógeno como gas de purga con un caudal de 20 ml/min. El tipo de cubeta de muestra era aluminio con poros y se determinó el peso de la muestra el día del análisis sobre una balanza Mettler M3.

25 Los datos se muestran en la Fig 14. Todas las muestras contienen ADN de plásmido, (10 mg/ml), en 40% de sacarosa. Fig 14A y B: las formulaciones también contienen: 100 mM de TrisHCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina y 2,9% de etanol; Fig 14A y C representan un ciclo de liofilización de 24 horas; Fig 14B y D representan un ciclo de liofilización de 1 hora. Los datos sugieren que todas las muestras contienen sacarosa amorfa observándose 30 temperaturas de transición vítrea de sacarosa a aproximadamente 78°C, (Fig 14A), 85°C, (Fig 14B), 74°C, (Fig 14C) y 63°C, (Fig 14D), que se ajusta bien a los valores publicados en la bibliografía, (5). Los datos sugieren que los ciclos de liofilización tanto largos como cortos pueden generar un vidrio de sacarosa amorfo. El vidrio amorfo se puede formar en la presencia de concentraciones altas de ADN de plásmido y también en la presencia de todos los excipientes descritos. Sin embargo, como no es evidente si o no algún material cristalino está presente en las muestras 35 o se han formado durante el propio análisis de DSC después se analizaron muestras adicionales mediante la técnica de microscopía de luz polarizada para determinar la naturaleza amorfa/cristalina de las muestras.

40 *Ánálisis de formulaciones de ADN de plásmido liofilizado, mediante microscopía de luz polarizada*

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

50 Los datos se muestran en la Fig 15 donde todas las formulaciones contienen ADN de plásmido, (10 mg/ml), en 40% de sacarosa. Fig 15A: las formulaciones también contienen: 100 mM de TrisHCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina y 2,9% de etanol, la Fig 15C: solamente contiene 40% de sacarosa y la Fig 15D: muestra cristales del excipiente sólido principal. 1AM, 2AM y 3AM representan un ciclo de liofilización de 24 horas, mientras 1ST, 2ST y 3ST representan un ciclo de liofilización de 1 hora.

55 A partir de la Fig. 15C es evidente que tanto los ciclos de liofilización de 1 hora como 24 horas realizados sobre 40% de sacarosa solo generan exclusivamente un vidrio amorfo como se esperaba. A partir de la Fig 15B, la adición de ADN de plásmido, (10 mg/ml) a la formulación de 40% de sacarosa, aunque permite en gran medida la formación de un vidrio amorfo, habilita la formación parcial de alguna sacarosa cristalina (las muestras 2AM y 2ST constan de material amorfo con alguna evidencia para algunas partículas cristalinas, que podrían ser sacarosa). Sin embargo, a partir de la Fig 15A, la adición de los excipientes al ADN/formulación de sacarosa reduce la cantidad de formulación 60 de partícula cristalina en muestras liofilizadas durante 24 horas (1AM, el grueso de la muestra consta de láminas de material amorfo). Existen pocas partículas cristalinas presentes), y para ciclos cortos de liofilización de 1 hora, no existe evidencia de la formación de partículas cristalinas, simplemente un vidrio amorfo. Esto sugiere que la adición de los excipientes descritos para el ADN de plásmido en sacarosa ayuda no solamente a mejorar la liberación y estabilidad de ADN de la degradación pero también ayuda a conservar el estado de vidrio amorfo tas ciclos cortos de liofilización.

Ejemplo 14

Demostración de formación de vidrio amorfo después de liofilización de ADN de plásmido, en formulaciones de poliol de azúcar diferentes que contienen excipientes

5 Para determinar si la naturaleza del poliol/azúcar presente en la formulación de ADN de plásmido con excipientes, como se ha descrito anteriormente, afectaba a la capacidad de tales formulaciones para generar vidrio amorfo tras liofilización, se varió el poliol. Se generaron un número de formulaciones similares que difieren solamente en el poliol 10 presente, se liofilizaron y se analizaron mediante microscopía de luz polarizada. Esto se realizó de una manera similar a la descrita en el ejemplo 13 excepto que en esta ocasión se usó un microscopio de luz polarizada Olympus BX51.

Los datos se muestran en la Fig 16 donde todas las formulaciones contienen ADN de plásmido liofilizado, (10 mg/ml), y 100 mM de TrisHCl pH 8,0, 1 mM de EDTA, 10 mM de metionina y 2,9% de etanol. La Fig 16A, muestra 1:40% p/v de ficoll, muestra 2:20% p/v de dextrano, muestra 3:40% p/v de sacarosa, muestra 4:20% p/v de maltotriosa. 15 Fig 16B, muestra 5:20% p/v de lactosa, muestra 6: 30% p/v de maltosa, muestra 7:40% p/v de glucosa, muestra 8:40% p/v de trehalosa. Hay que hacer notar que todas las muestras y todas las formulaciones analizadas formaban un vidrio amorfo estando presente poca o ninguna evidencia de material cristalino. Hay que hacer notar que la formulación descrita como muestra 2, que contiene 20% p/v de dextrano, se mostró posteriormente que han precipitado el ADN de plásmido en solución, mediante análisis electroforético de agarosa, (datos no mostrados), y por lo tanto no sería 20 una formulación preferida. Estos datos demuestran que el ADN de plásmido más los excipientes descritos se pueden mantener, cuando se liofiliza, en un estado de vidrio amorfo mediante una diversidad de polioles/azúcares descritos en la bibliografía, (Hatley, R y Blair, J., (1999), Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 7: 11 - 19.).

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN que tiene al menos una microaguja que perfora la piel que comprende un miembro de apoyo revestido con un medio de depósito sólido que contiene el agente farmacéutico de ADN, y un agente de estabilización que inhibe los efectos degradantes de los radicales libres.
- 10 2. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 1 en el que el agente de estabilización es uno o ambos de un quelante de ion metálico y un inactivador de radical libre.
- 15 3. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 2 en el que el agente de metalización de iones metálico se selecciona entre el grupo constituido por inositol hexafosfato, tripolifosfato, ácido succínico y málico, ácido etilendiamina tetraacético (EDTA), tris(hidroximetil)amino metano (TRIS), Desferal, ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA) y ácido etilendiamindihidroxifenilacético (EDDHA).
- 20 4. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 2 en el que el inactivador de radical libre no reductor se selecciona entre el grupo constituido por etanol, metionina o glutatión.
- 25 5. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 2 en el que el agente de estabilización que inhibe los efectos degradantes de los radicales libres, es (a) una solución de etanol tamponada con fosfato en combinación con metionina o EDTA, o (b) EDTA tamponado con Tris en combinación con metionina o etanol (o combinaciones de metionina y etanol).
- 30 6. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el medio de depósito es un poliol amorofo.
7. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 6, en el que el poliol es un poliol de estabilización.
- 35 8. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7 en el que el medio de depósito biodegradable sólido es un azúcar.
9. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 8 en el que el azúcar se selecciona entre lactosa, glucosa, sacarosa, rafinosa o trehalosa.
- 40 10. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9 en el que el medio de depósito sólido está en la forma de un vidrio.
11. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 10, en el que el medio de depósito sólido está en la forma de un vidrio de azúcar.
- 45 12. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 en el que el ADN es ADN de plásmido superenrollado.
13. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 12, en el que el ADN de plásmido superenrollado se estabiliza de manera que después del almacenamiento a 37°C durante 4 semanas es mayor que 50% del ADN que permanece en la forma superenrollada.
- 50 14. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 12, en el que el ADN se estabiliza de manera que cuando se libera de la relación de la forma monomérica:dimérica superenrrollada está dentro del intervalo de 0,8:1,2.
15. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 14 en el que el medio de depósito biodegradable sólido libera el agente farmacéutico dentro de 24 horas después de la inserción de la microaguja que perforan la piel en la piel.
- 55 16. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15 en el que los miembros que perforan la piel están dimensionados para administrar el agente en la dermis.
- 60 17. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en el que los miembros que perforan la piel están dimensionados para administrar el agente en la epidermis.
- 65 18. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 17 en el que los miembros de apoyo son agujas sólidas, microcánulas o microcuchillas.

ES 2 322 572 T3

19. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, en el que el dispositivo es un dispositivo de electroporación.
- 5 20. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 19 en el que los miembros de apoyo revestidos del dispositivo son los electrodos del dispositivo de electroporación.
21. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 20, en el que el agente farmacéutico es una vacuna.
- 10 22. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN como se reivindica en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 21, en el que el medio de depósito sólido comprende además un adyuvante de vacuna, agente que facilita la transfección, inhibidor de la ADNasa o un envenenador de cristal.
- 15 23. Un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 22, en el que el adyuvante se selecciona entre el grupo constituido por CpG, una imidazoquinolina sintética, tularesol, citoquinas, MPL, QS21, QS7 y emulsiones de aceite en agua.
- 20 24. Un procedimiento para la preparación de un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 1, que comprende la preparación de una solución de agente farmacéutico de ADN, medio de depósito, y agente de estabilización que inhibe los efectos degradantes de los radicales libres en un disolvente, seguido de revestimiento de al menos un miembro de apoyo con dicha solución, y eliminar el disolvente para formar un medio de depósito sólido que contiene el agente farmacéutico y agente que inhibe los efectos degradantes de los radicales libres.
- 25 25. Un procedimiento para la preparación de un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 24, en el que el medio de depósito es un azúcar.
- 30 26. Un procedimiento para la preparación de un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 25 en el que la concentración de azúcar antes de secar sobre el miembro de apoyo está en el intervalo de 20 - 40% p/v.
27. Un procedimiento para la preparación de un dispositivo de administración de agente farmacéutico de ADN según la reivindicación 24, en el que el disolvente se desmetaliza antes del procedimiento.
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

Fig.1A.

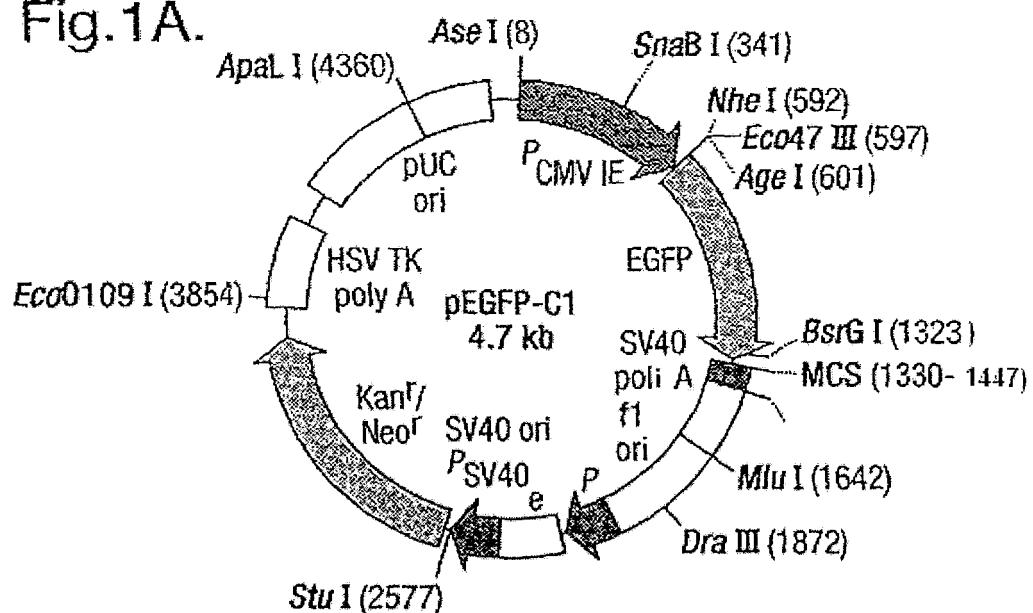


Fig.1B.

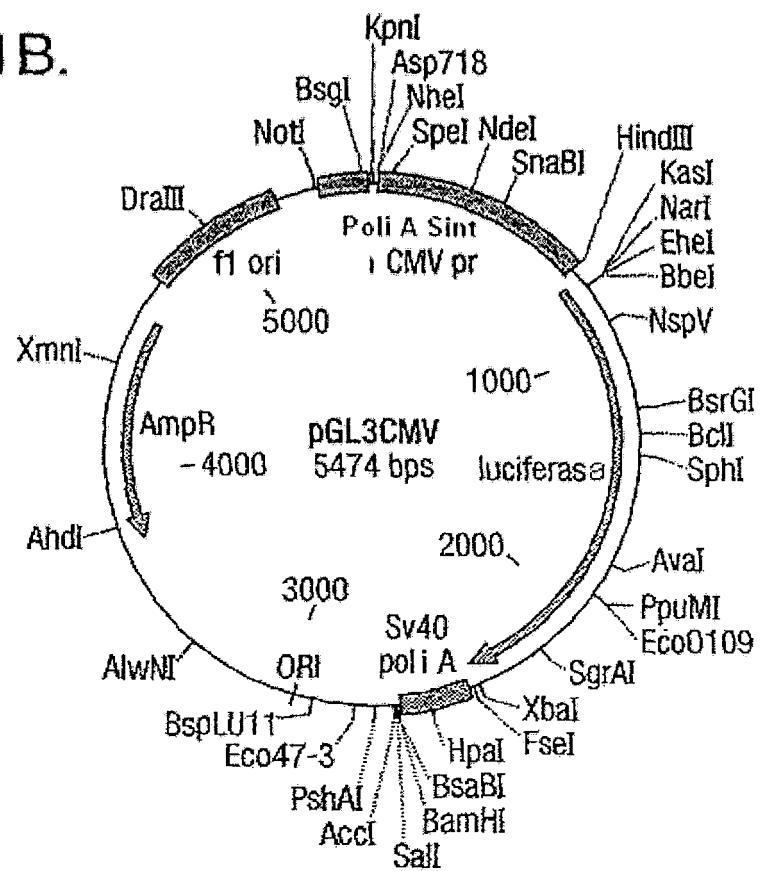


Fig. 1C.

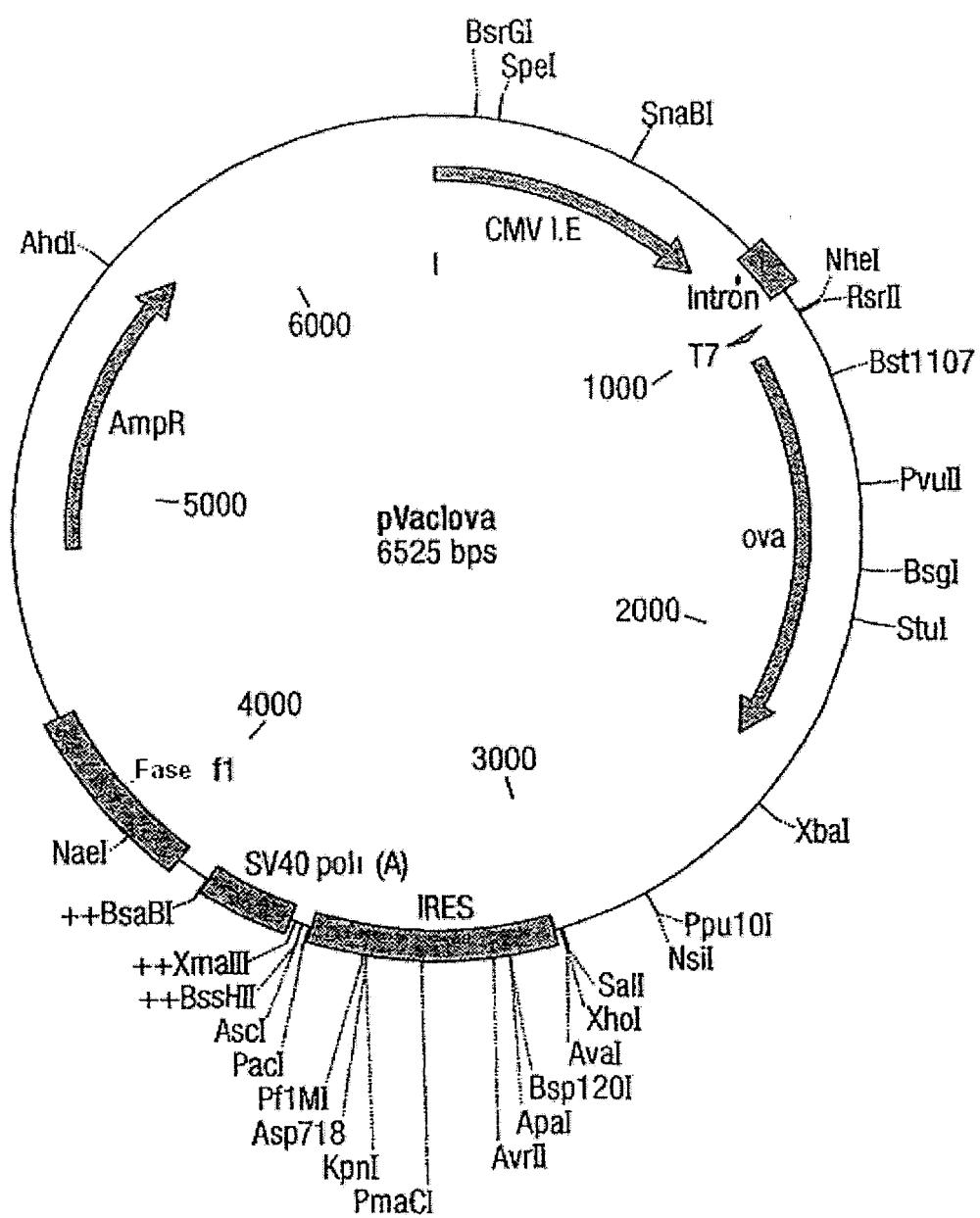


Fig.2.

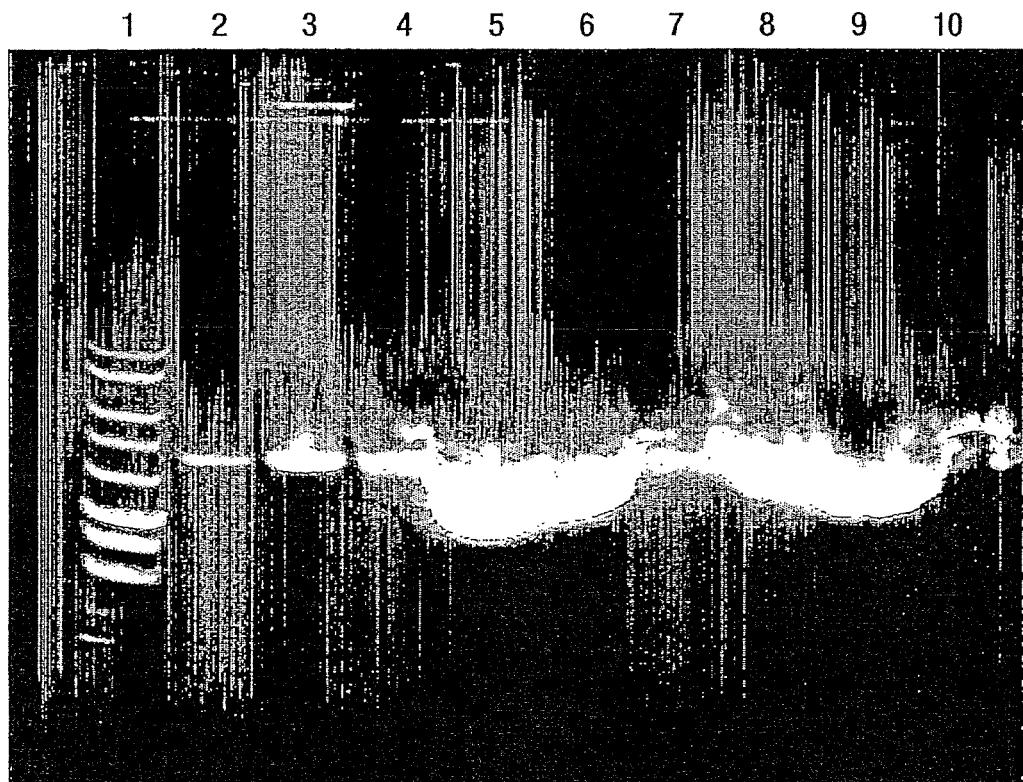


Fig.3A.

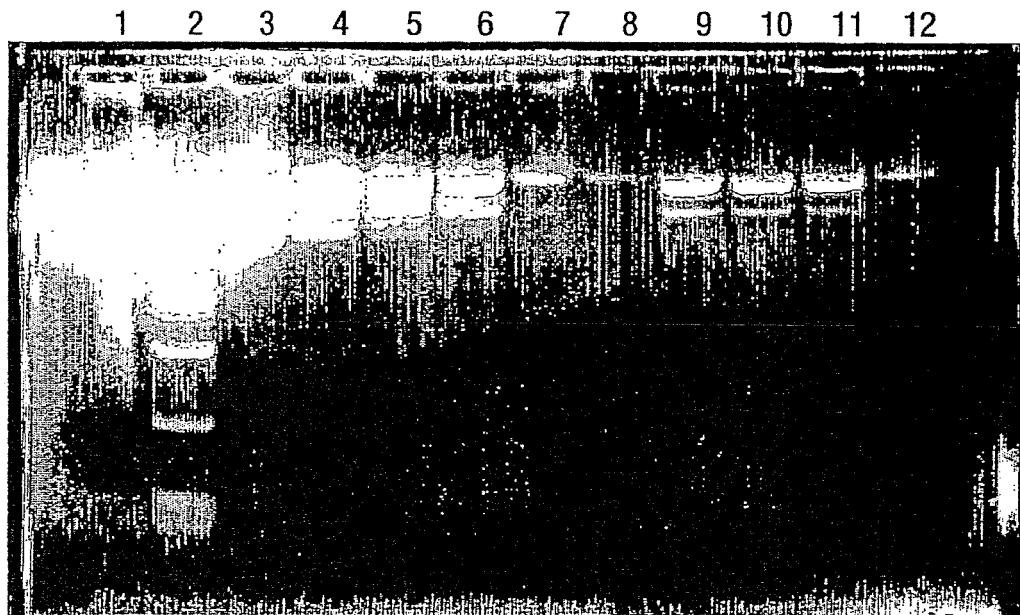


Fig.3B.

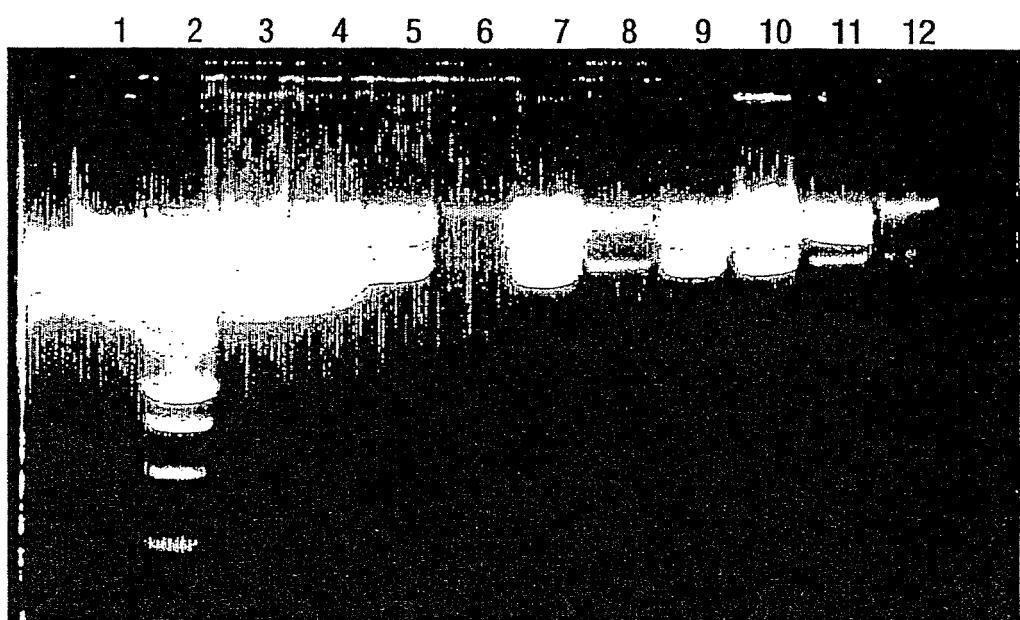


Fig.4A.

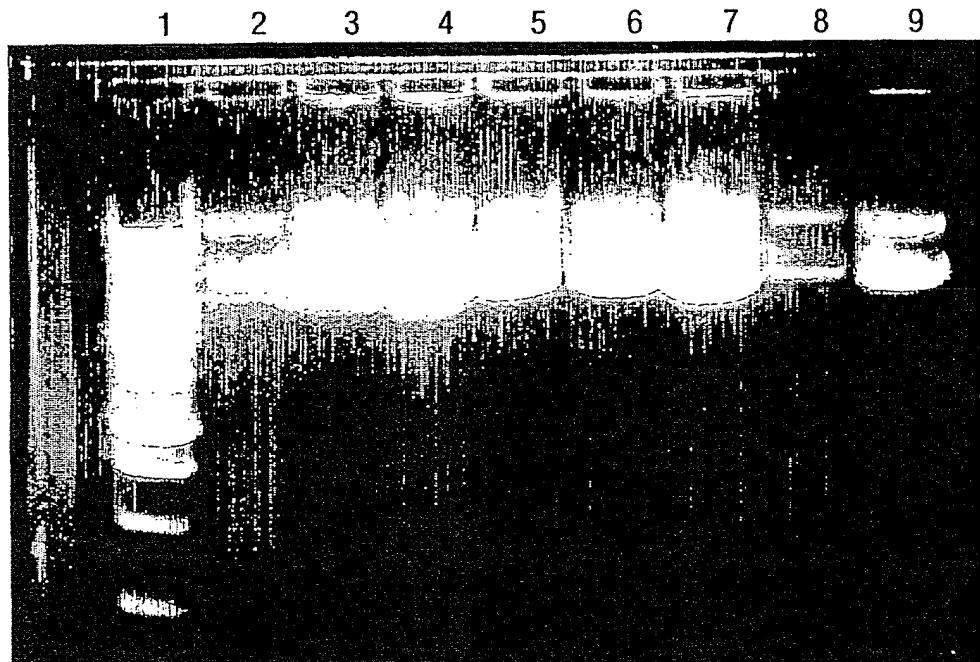


Fig.4B.

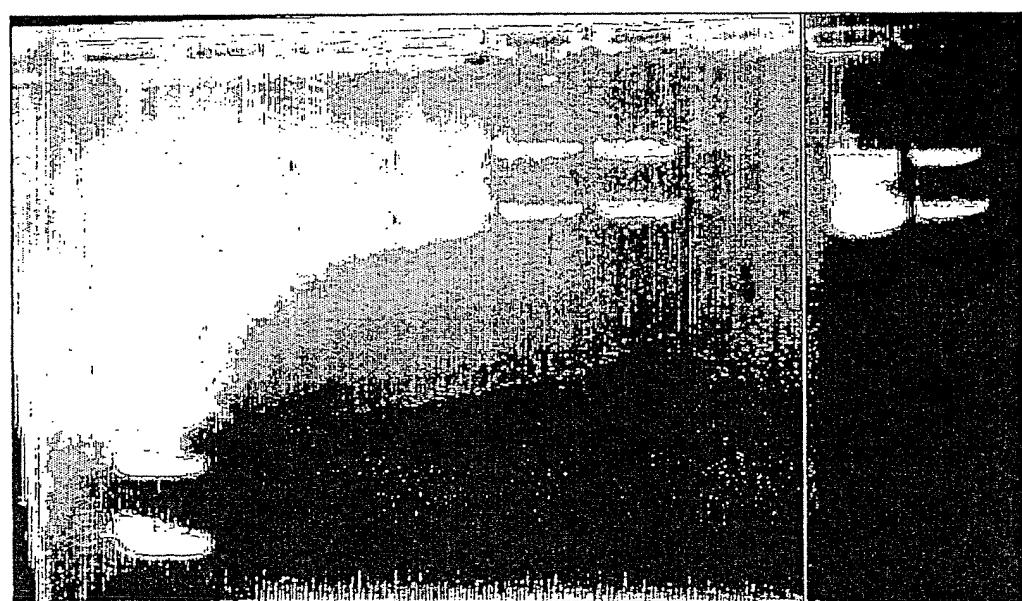


Fig.5A.

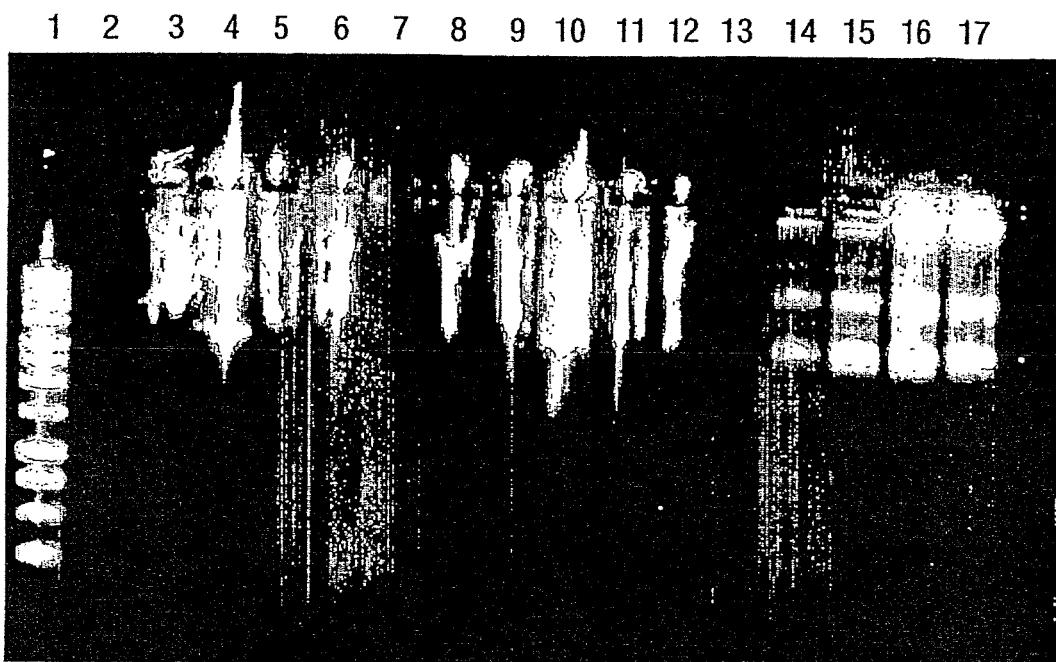


Fig.5B.

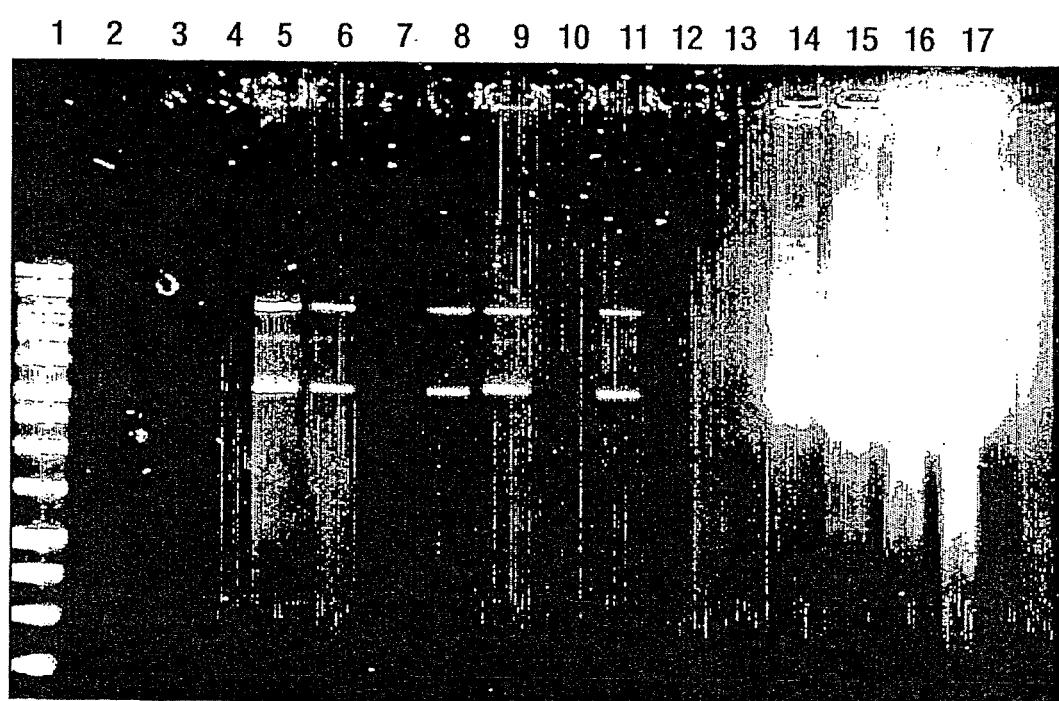


Fig.6.

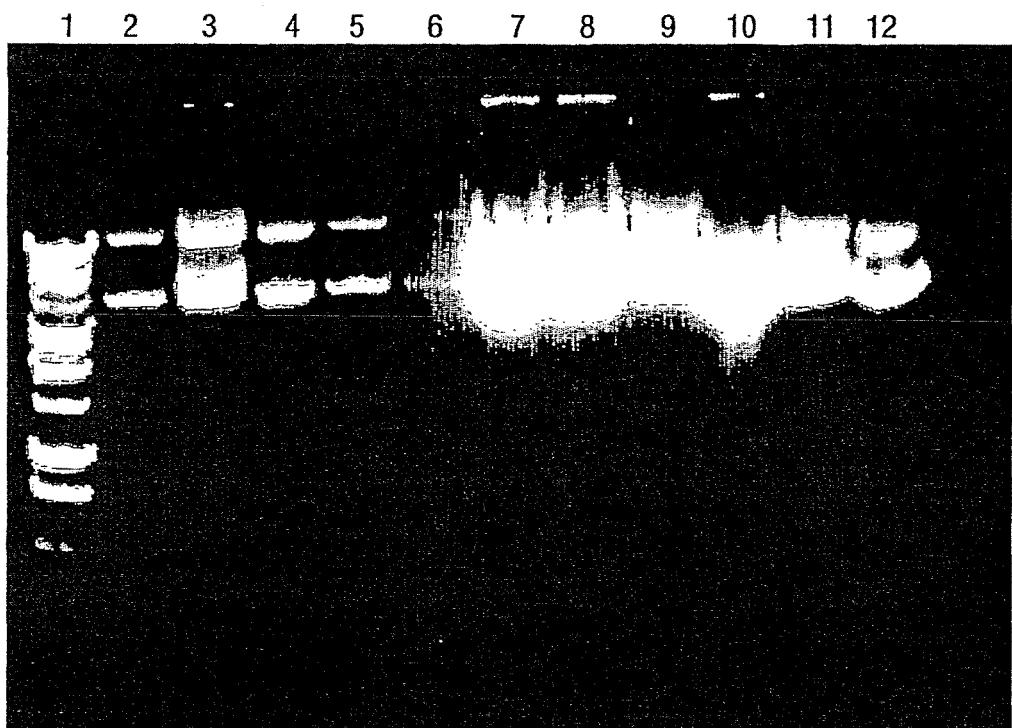


Fig. 7.

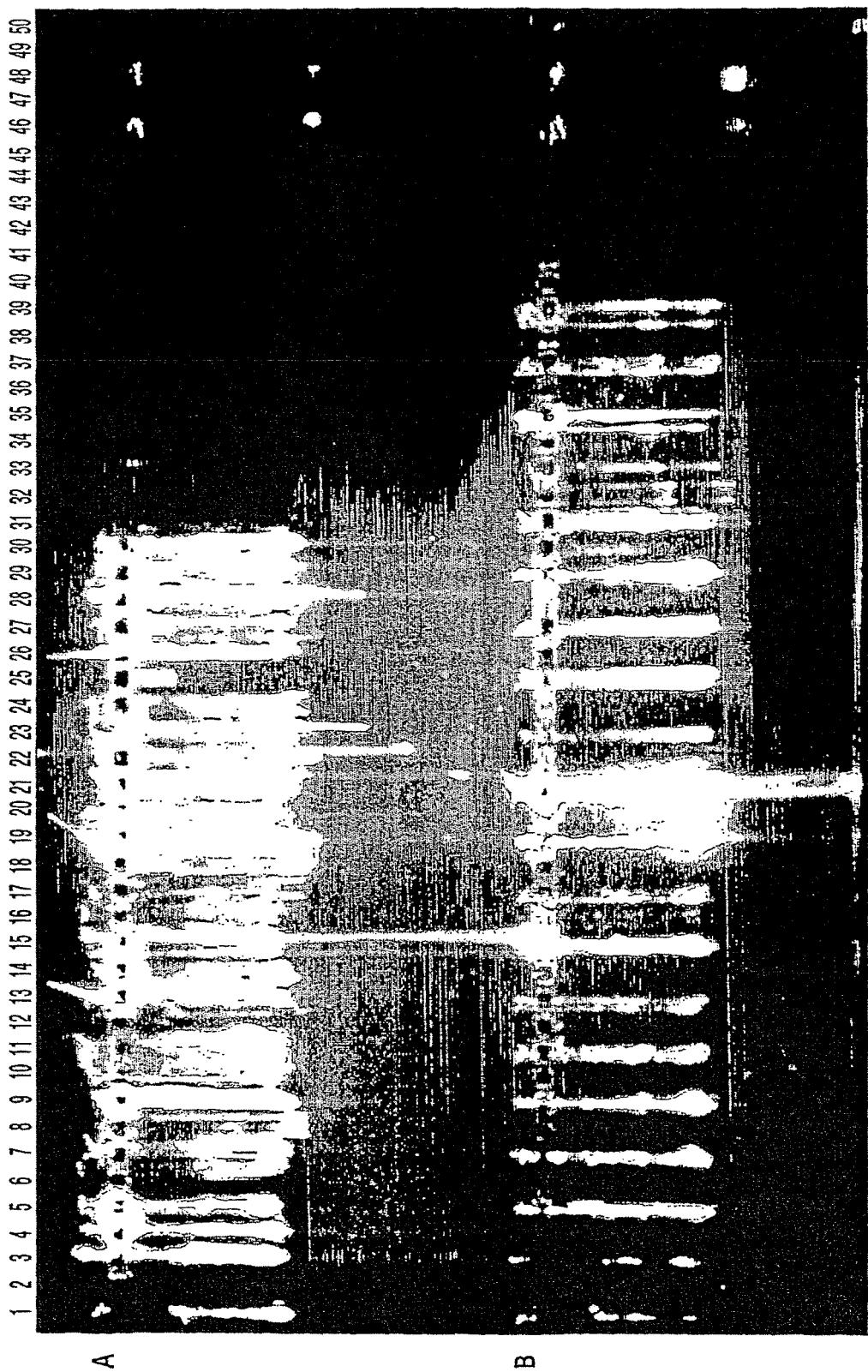


Fig.8.

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20

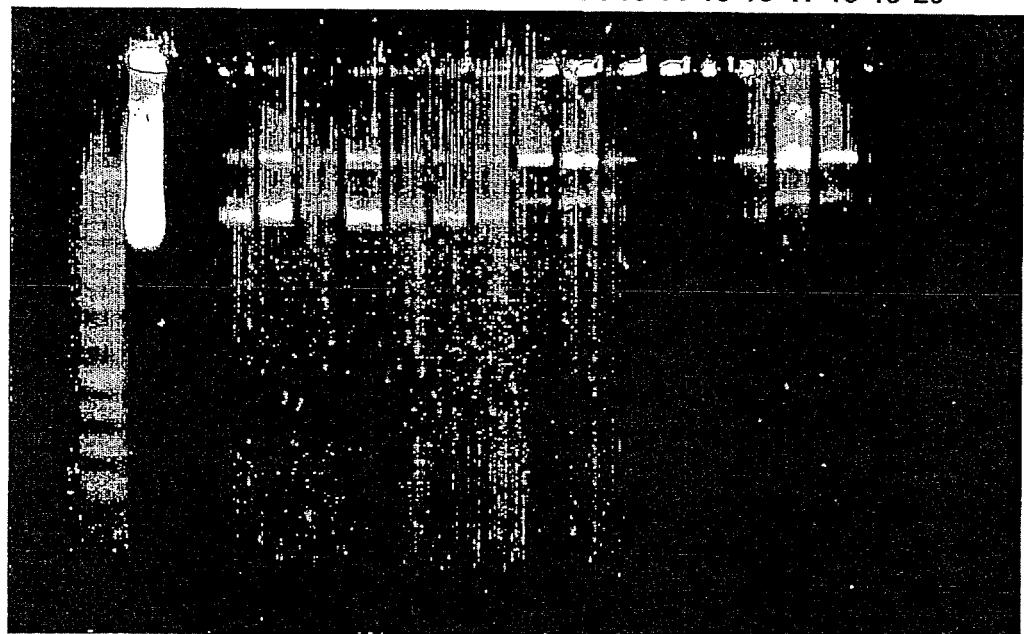


Fig.9A.

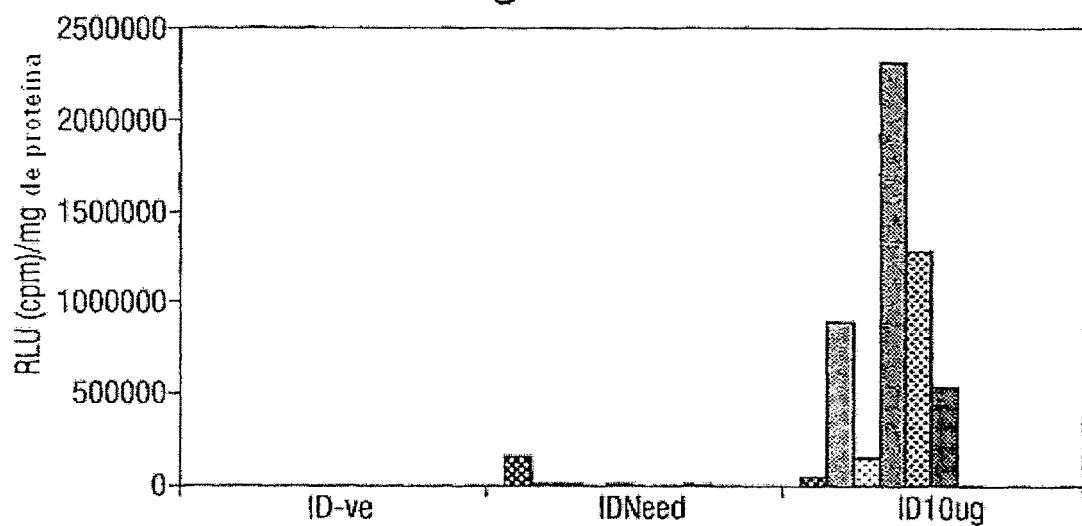


Fig.9B.

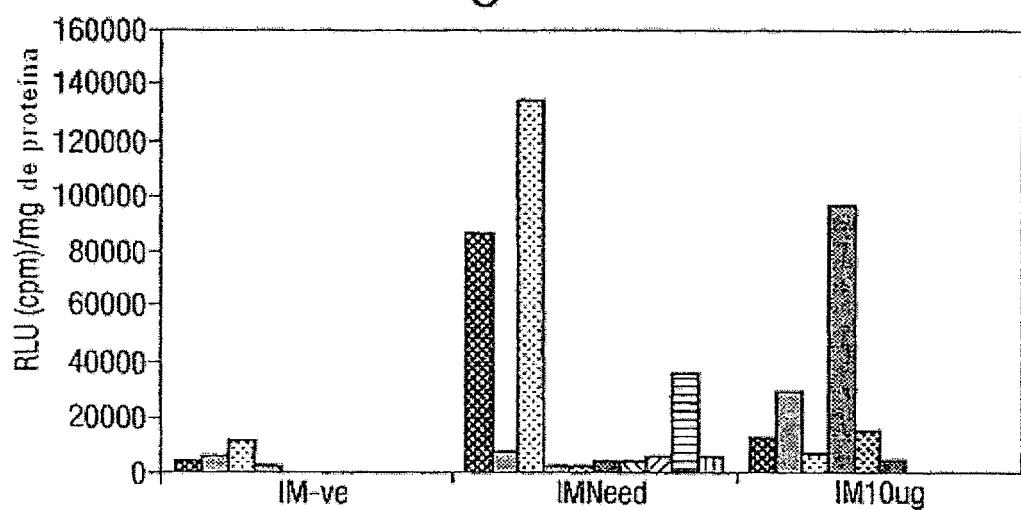


Fig.10.

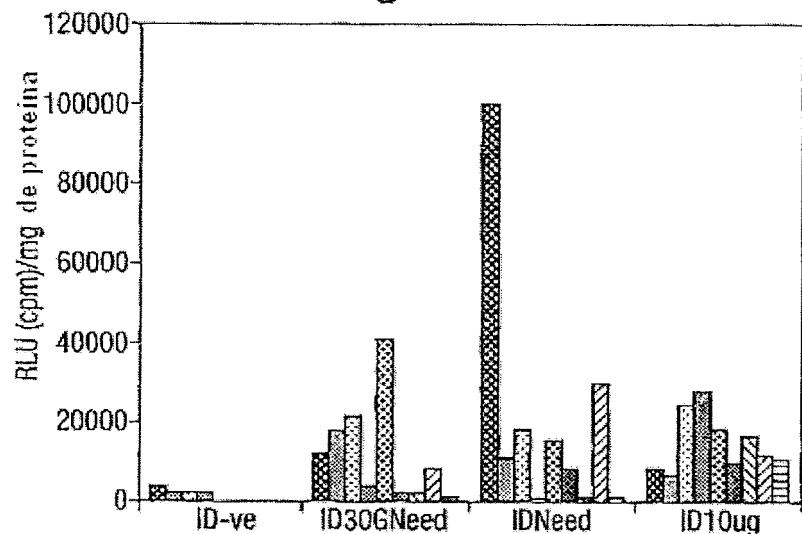


Fig.11A.

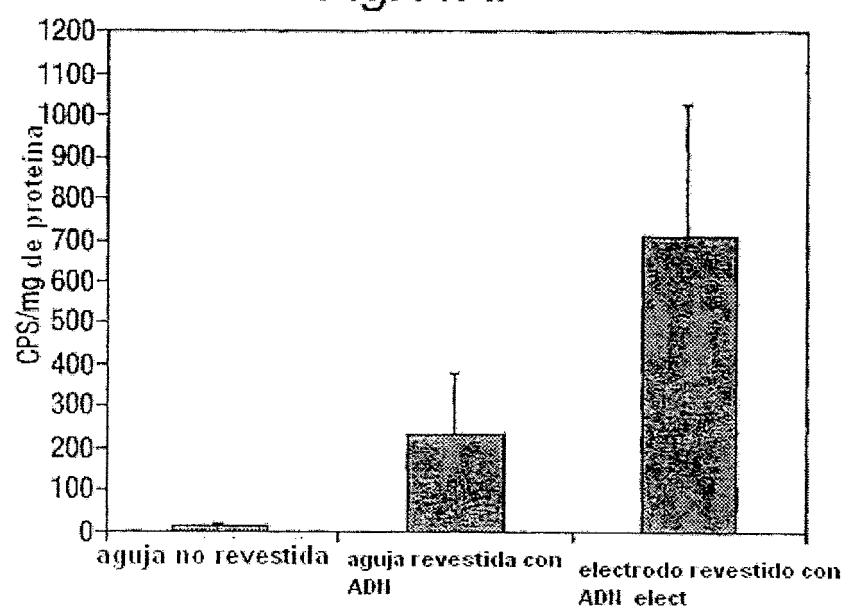


Fig.11B.

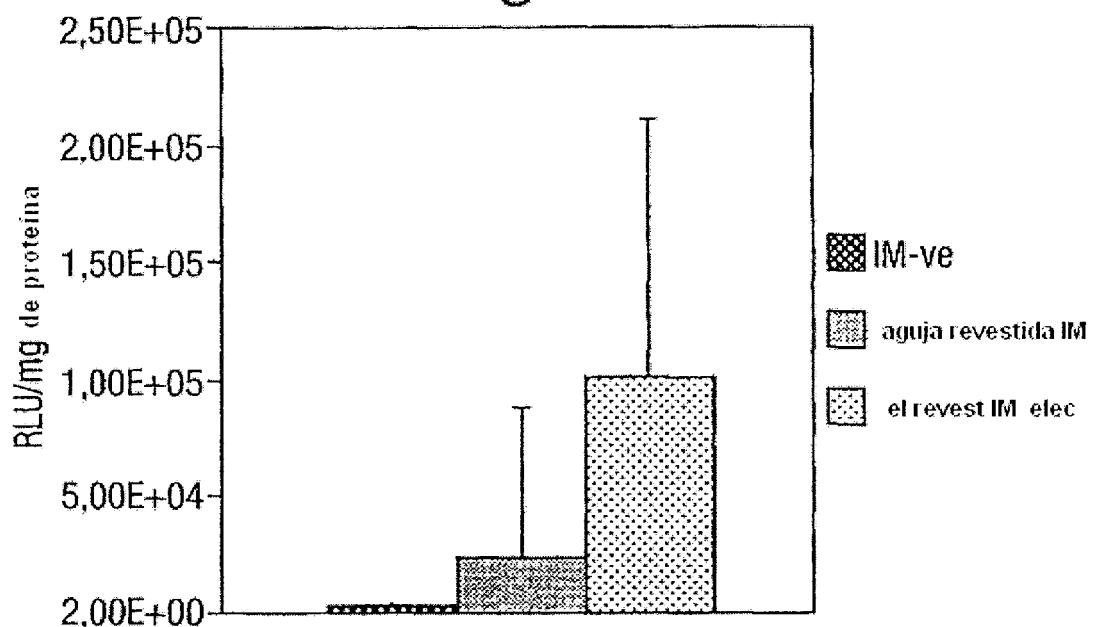


Fig.12B.

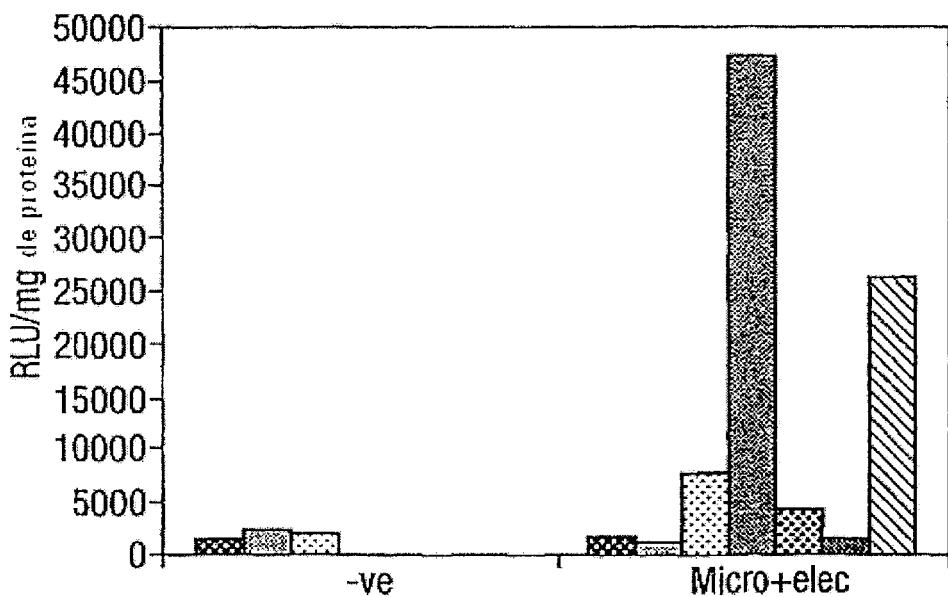


Fig.13A.

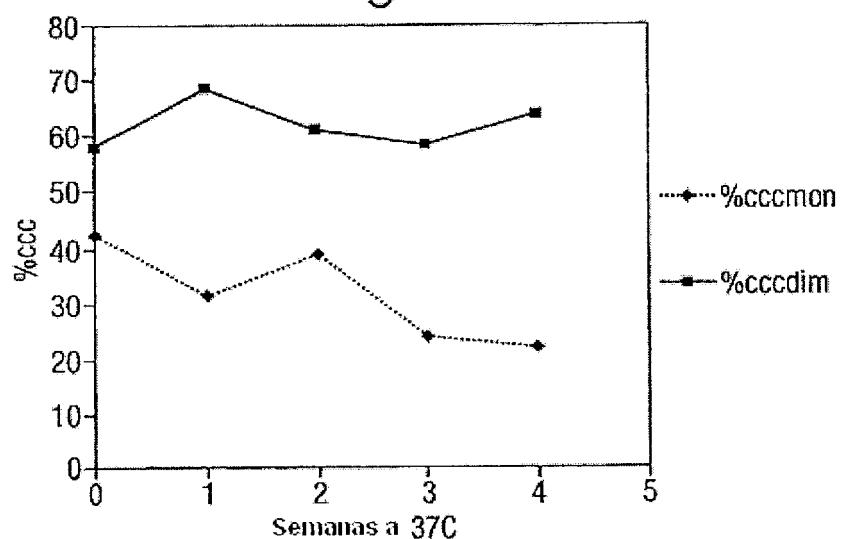


Fig.13B.

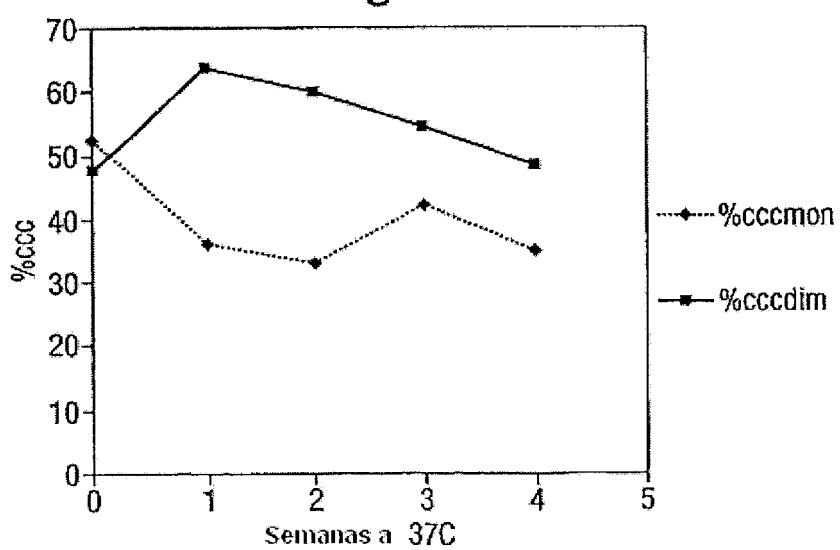


Fig.13C.

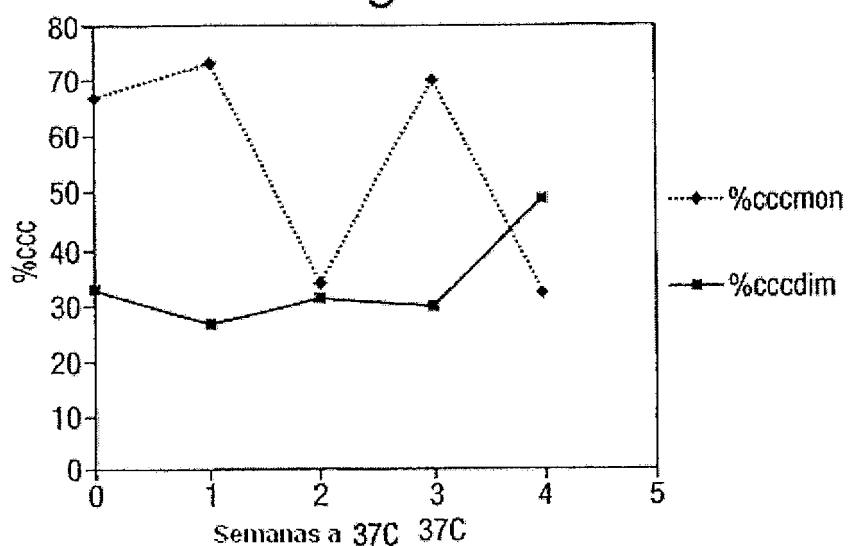


Fig.13D.

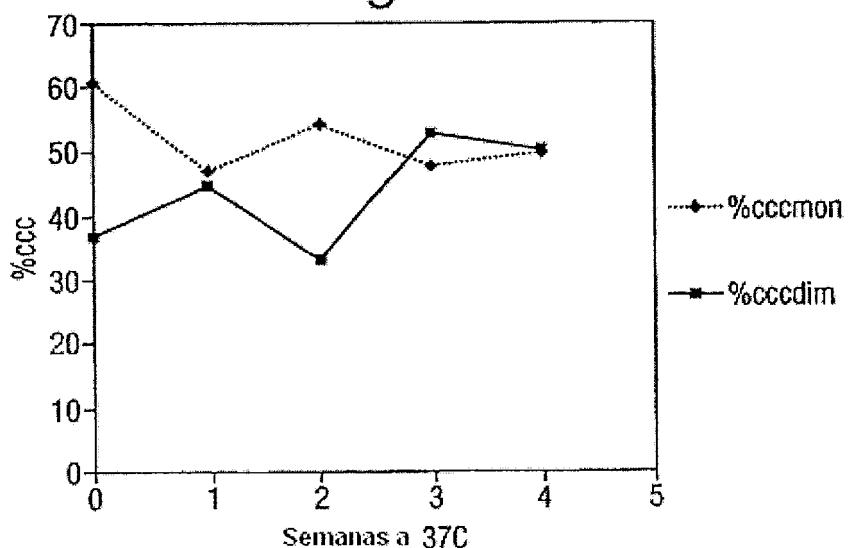


Fig.13E.

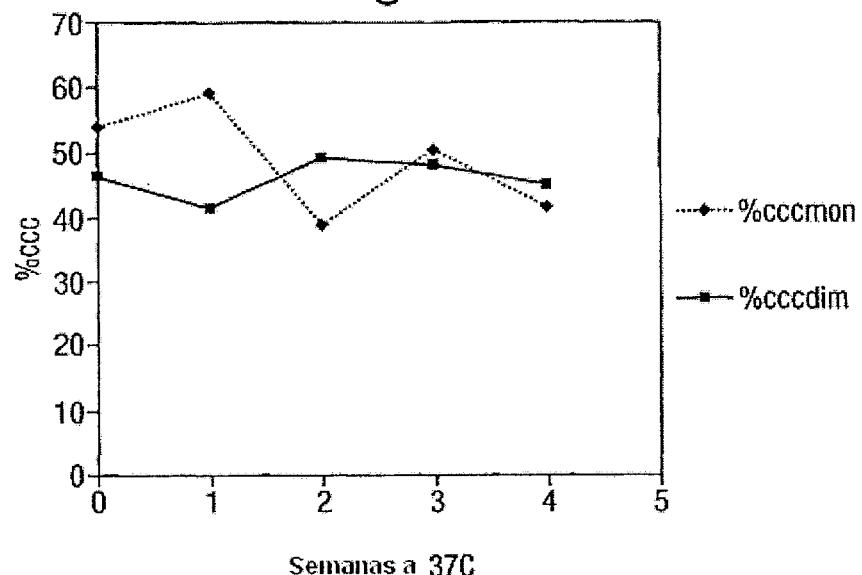


Fig.13F.

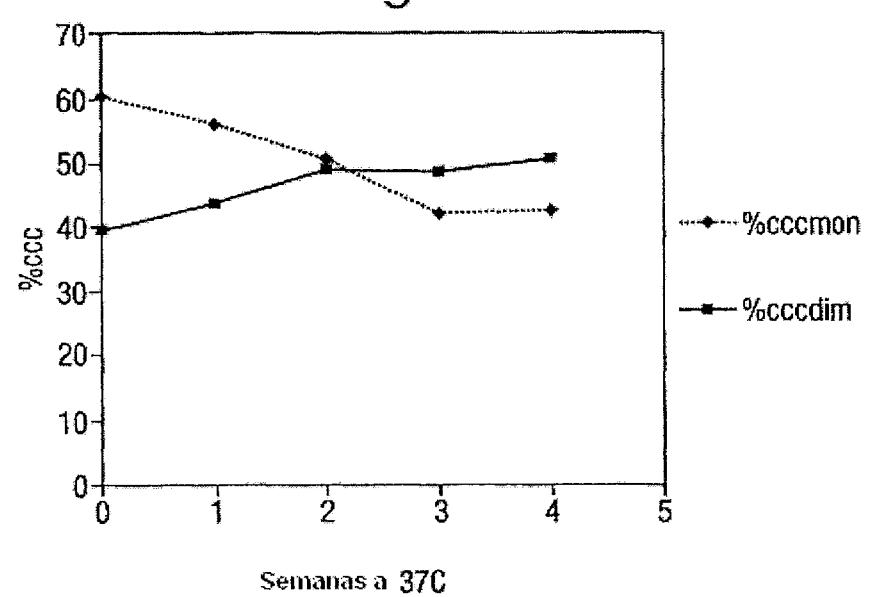


Fig. 14A.

Muestra : formul. sacarosa liofilizada, 1AM
 Tamaño : 3,3370 mg
 Procedimiento: M7049
 Comentario : Biomax; DSC 050566 Balance 022722

Fichero : X...\\DSC-archivo\\DSC-Arch_D10\\01082.01
 Operator : Hilary Cannon M7049
 Fecha ensayo: 14-feb-02 14:15
 Instrumento: 2920 MDSC V2.6A

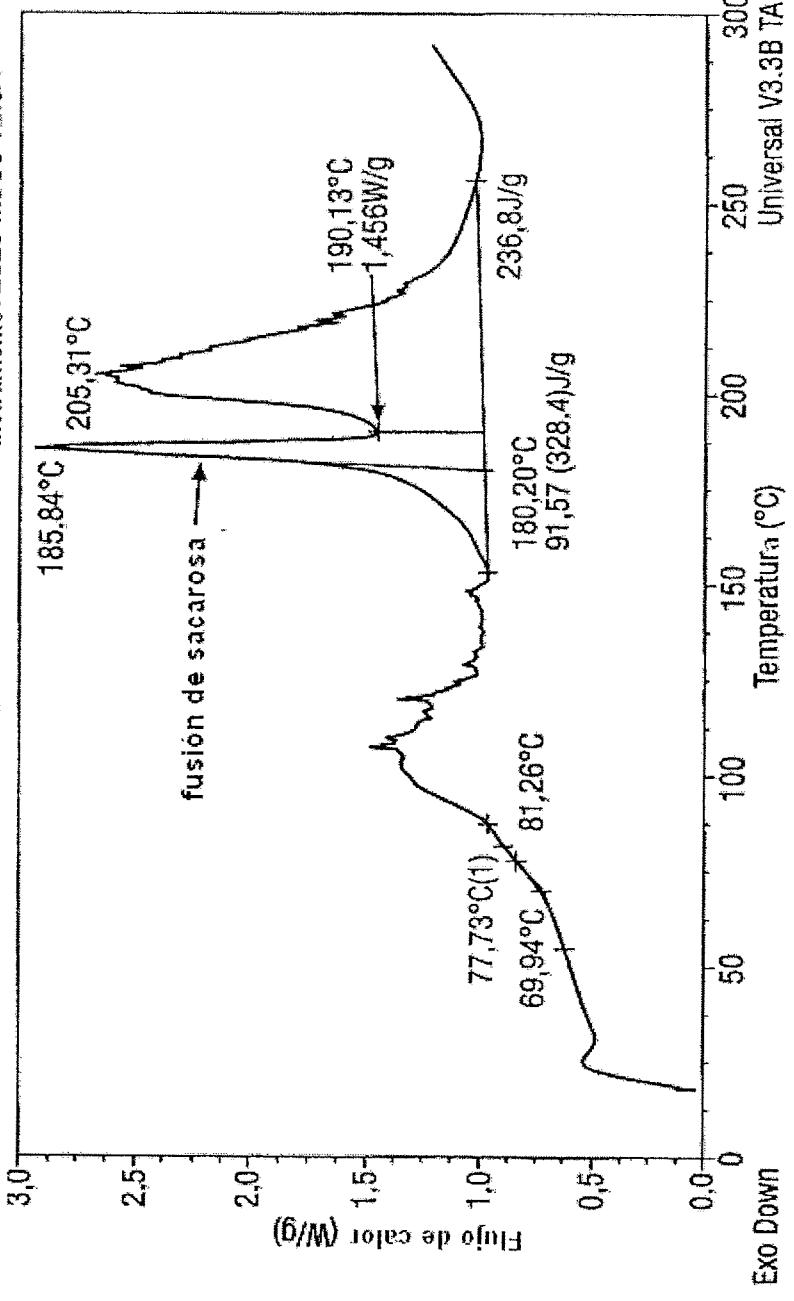


Fig. 14B.

Muestra : formul. sacarosa liofilizada, 1ST
 Tamaño : 2,9730 mg
 Procedimiento : M7049
 Comentario : Biomax: DSC 050566 Balance 022722

Fichero : X:\DSC-archivos\DSC-Arch_D10\1082.04

Operador : Hilary Cannon M7049

Fecha ensayo: 14-feb-02 15:03

Instrumento : 2920 MDSC V2.6A

DSC

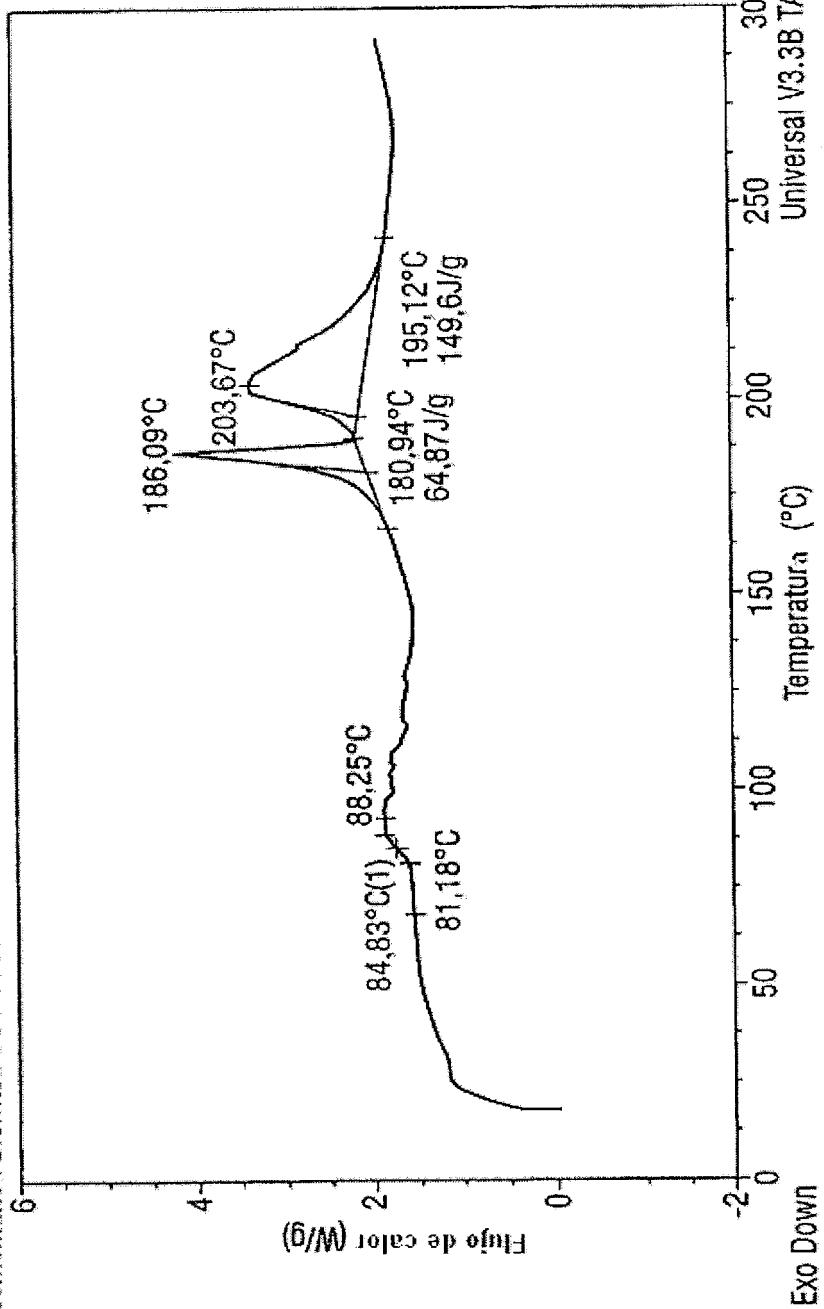
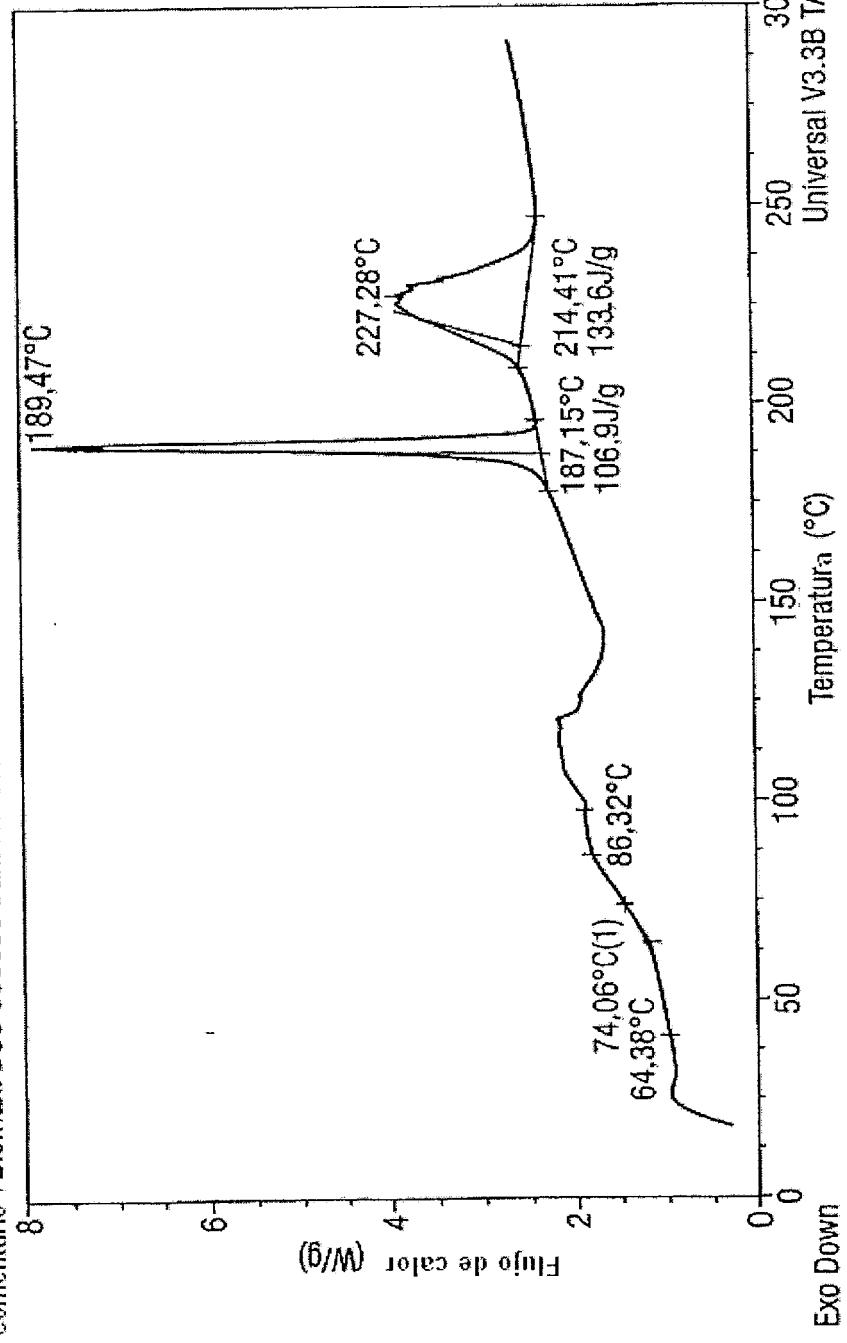


Fig. 14C

Muestra : formul. sacarosa liofilizada. 2AM
 Tamaño : 2,3300 mg
 Procedimiento : M7049
 Comentario : Biomax: DSC 050566 Balance 022722



Muestra : formul. sacarosa liofilizada, 2ST
 Tamaño: 2,9570 mg
 Procedimiento: M7049
 Comentario : Biomax: DSC 050566 Balance 022722

Fig. 14 D Fichero : X:\DSC-archivos\,DSC-Arch_D10\,D1082.05

Operator : Hilary Cannon M7049

Fecha ensayo: 14-feb-02 15:52

Instrumento: 2920 MDSC V2.6A

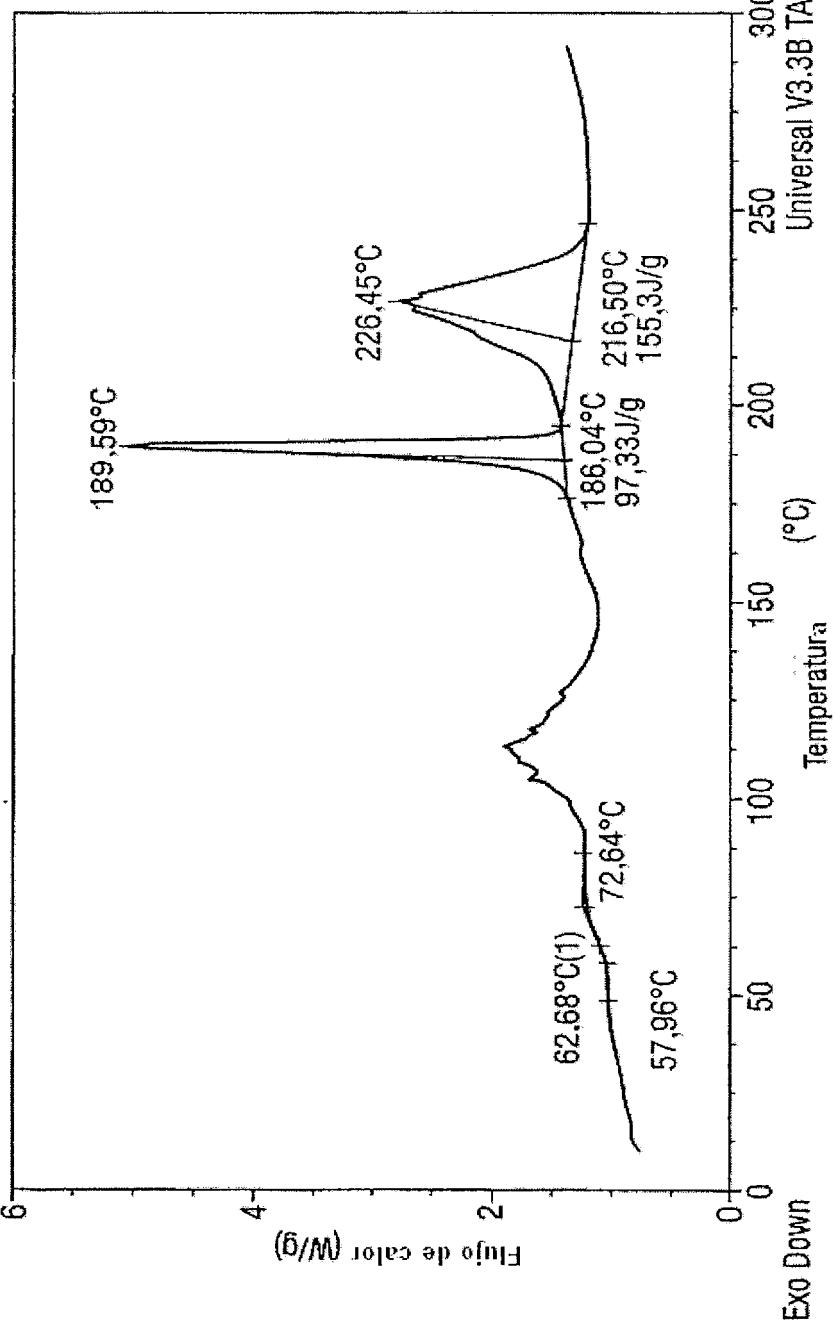


Fig. 15A.

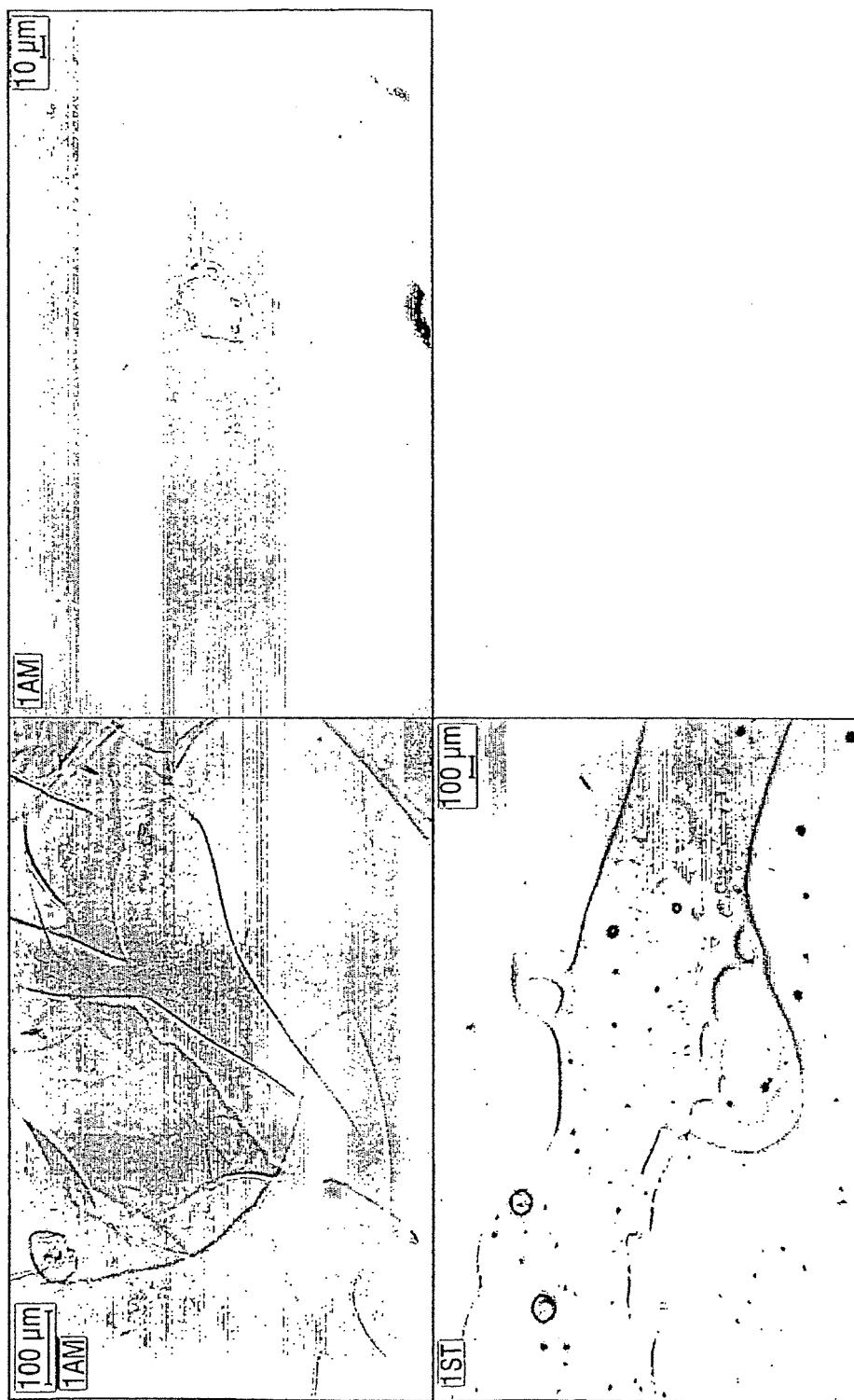


Fig. 15B.

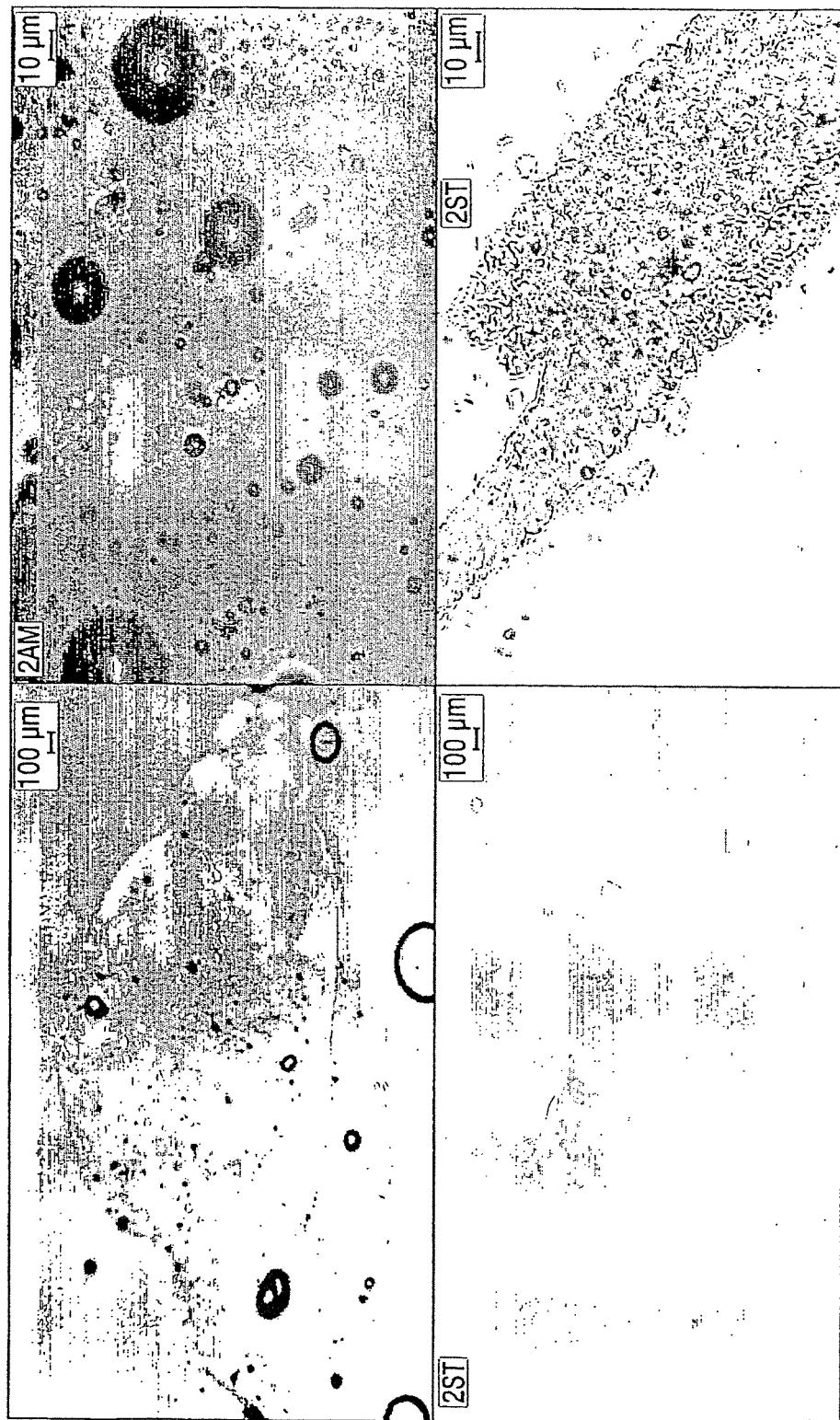


Fig. 15C.



Fig. 15D.

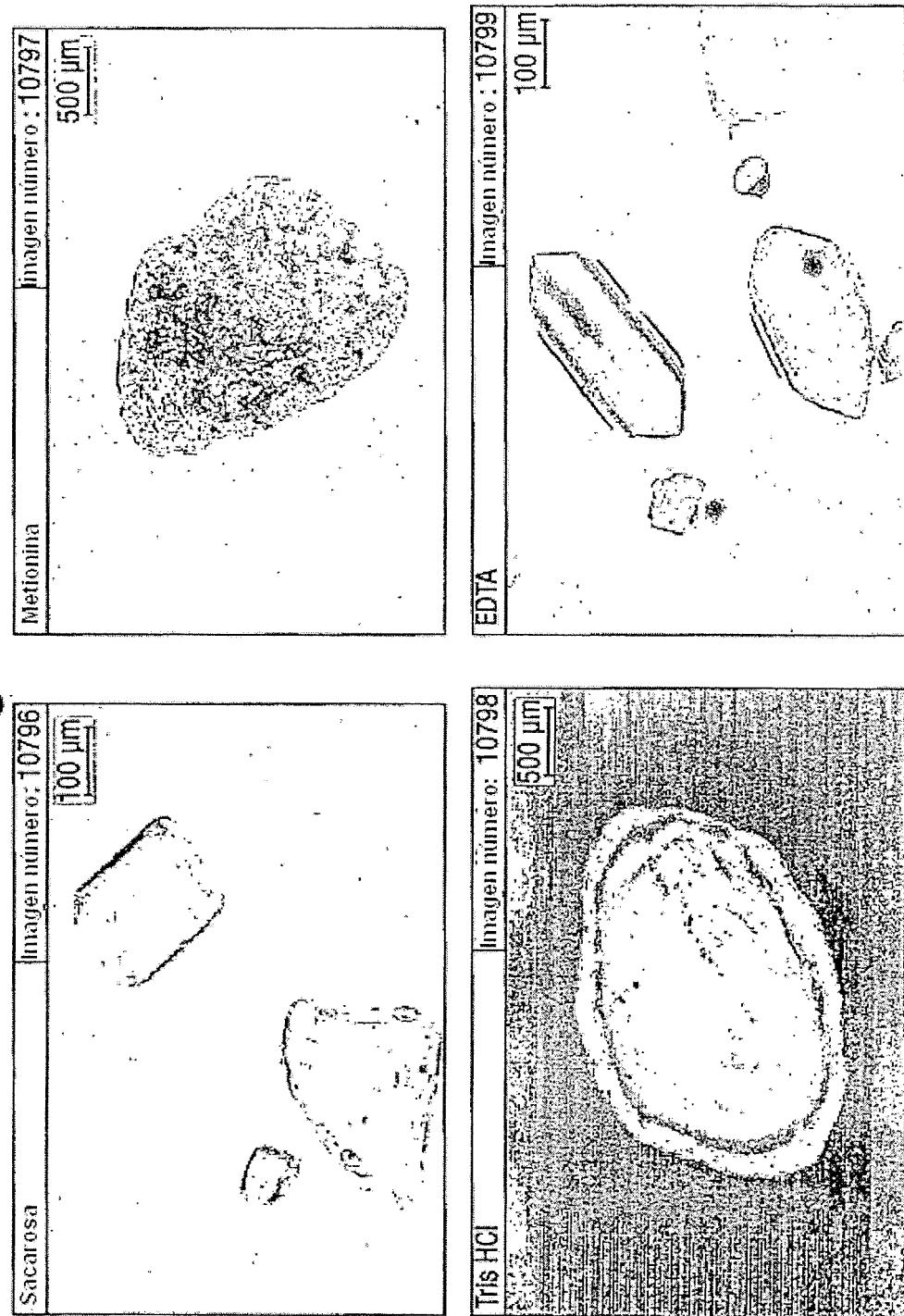


Fig. 16A.

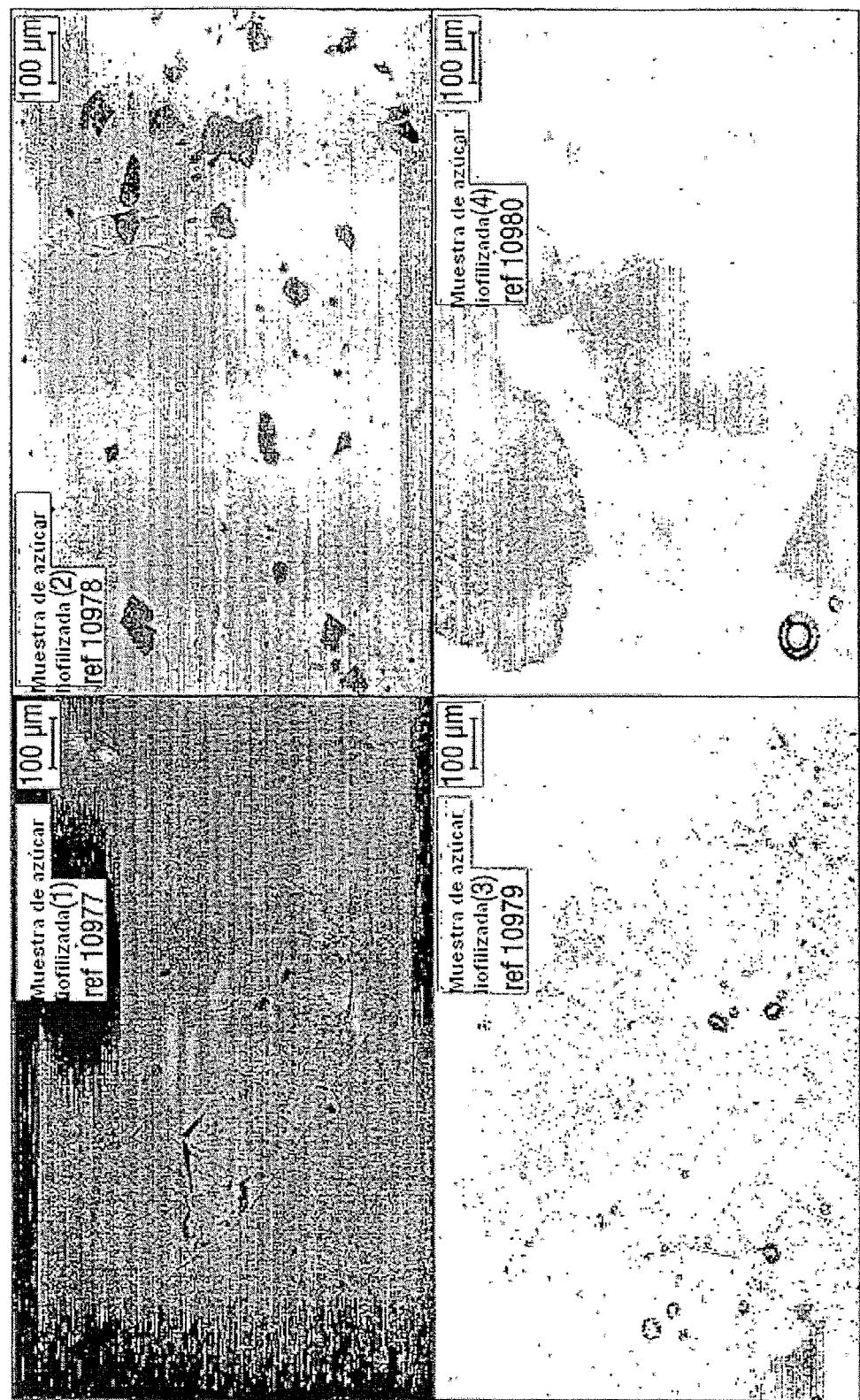


Fig. 16B.

