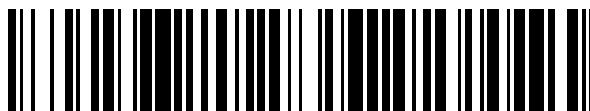


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 675**

51 Int. Cl.:

C12N 1/21	(2006.01)	C12R 1/19	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01)		
C12N 15/10	(2006.01)		
C12N 15/12	(2006.01)		
C12N 15/09	(2006.01)		
C07K 14/475	(2006.01)		
C07K 14/435	(2006.01)		
A61K 35/74	(2015.01)		
A61K 38/18	(2006.01)		
A61P 9/00	(2006.01)		

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.08.2013** **PCT/RU2013/000669**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **06.03.2014** **WO14035289**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.08.2013** **E 13832746 (5)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.01.2017** **EP 2890777**

54 Título: **Una composición farmacéutica que comprende PCMV-VEGF165 para la estimulación de angiogénesis**

30 Prioridad:

31.08.2012 RU 2012137126

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.07.2017

73 Titular/es:

"NEXTGEN" COMPANY LIMITED (100.0%)
ul. Gubkina, 3, korp. 1
Moscow 119333, RU

72 Inventor/es:

KISELEV, SERGEJ L'VOVICH;
DEEV, ROMAN VADIMOVICH;
VOROB'EV, IVAN IVANOVICH;
ORLOVA, NADEZHDA ALEKSANDROVNA y
ISAEV, ARTUR ALEKSANDROVICH

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 621 675 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

Una composición farmacéutica que comprende PCMV-VEGF165 para la estimulación de angiogénesis

Campo de la invención

Un objeto de la presente divulgación concierne a la biotecnología, en concreto, a una cepa productora de ADN del plásmido, la composición farmacéutica correspondiente, que es capaz de inducir el crecimiento de los vasos sanguíneos (vascularización) en el lugar de la inyección y su aplicación en terapias complejas para la isquemia de extremidad inferior aterosclerótica, así como en el tratamiento de heridas y úlceras de diversos orígenes, y un procedimiento para el almacenamiento de ADN del plásmido purificado.

Explicación de los antecedentes

La genoterapia con ADN del plásmido desnudo para el tratamiento de enfermedad o vacunación contra patógenos o antígenos de células tumorales permite el desarrollo de formas de dosificación acabadas de ADN terapéutico que se pueden almacenar, transportar y que los especialistas pueden utilizar en condiciones desfavorables, y en particular a temperaturas positivas o en ascenso. La estabilidad física y química del ADN del plásmido almacenado se define significativamente por la composición de los excipientes, su concentración y/o el contenido de la forma de dosificación acabada y/o las condiciones de almacenamiento (Schleef M., Schmidt T., Animal-free production of ccc-supercoiled plasmids for research ADN clinical applications, J. Gene Med., 6 Suppl 1:S45-53 (2004)). El proceso principal que afecta a una forma farmacéuticamente activa del ADN del plásmido almacenado es la degradación de la cadena de ADN que conduce a la formación de ADN del plásmido cíclico relajado y, seguidamente, una forma lineal de doble cadena. Se sabe que cuando una solución de ADN del plásmido congelada se almacena a una temperatura por debajo de menos 80 °C, la degradación de la forma ADN superenrollado es prácticamente imperceptible (Walther W., Stein U., Voss C., Schmidt T., Schleef M., Schlag P. M., Stability analysis for long-term storage of naked DNA: impact on non viral in vivo gene transfer, Anal Biochem., 318(2):230-5 (2003)). Dicho procedimiento de almacenamiento del ADN del plásmido no se puede utilizar de manera generalizada en la práctica clínica y, en la mayoría de los casos, los centros sanitarios y las farmacias no cuentan con el equipo de refrigeración necesario. Resulta bastante difícil transportar formas de dosificación acabadas y mantener una temperatura tan baja del producto. La selección de composiciones y concentraciones de excipientes apropiadas puede tener como resultado una solución de ADN del plásmido que sea estable durante 12 meses si se almacena a 4 °C o durante tres años si es almacena a 20 °C (Przybylowski M., Bartido S., Borquez-Ojeda O., Sadelain M., Riviere I., Production of clinical-grade plasmid DNA for human Phase I clinical trials ADN large animal clinical studies, Vaccine, 25(27):5013-24 (2007)).

El procedimiento que prevalece sobre todo para el desarrollo de formas de dosificación más estables es la liofilización. Por regla general, las formas de dosificación liofilizadas son estables a 4 °C durante varios años y, en algunos casos, se puede almacenar un producto a temperatura ambiente durante varios meses o incluso dos años. La liofilización también permite cambiar la concentración del principio activo, pudiéndose cargar viales con una pequeña cantidad de solución controlada y pudiéndose aumentar el volumen hasta el nivel necesario para la disolución del producto. Es posible recurrir a la liofilización de soluciones hipotónicas y la posterior disolución del liofilizado con una solución salina o una solución con osmolaridad normal (Anchordoquy T. J., Armstrong T. K., Molina M. C., Low molecular weight dextrans stabilize nonviral vectors during lyophilization at low osmolalities: concentrating suspensions by rehydration to reduced volumes, J Pharm Sci., 94(6):1226-36 (2005)).

Normalmente, la liofilización de soluciones de ADN plasmídico aumenta la estabilidad del producto para el posterior almacenamiento, pero los procedimientos de congelación y sublimación al vacío pueden dañar significativamente la estructura superenrollada del ADN del plásmido (Anchordoquy T. J., Armstrong T. K., Molina M. C., Allison S. D., Zhang Y., Patel M. M., y col., Physical stabilization of plasmid DNA-based therapeutics during freezing ADN drying, In: Costantino HR, Pikal M.J., editors. Lyophilisation of biopharmaceuticals, AAPS press; pp. 605-41 (2004)). En particular, la liofilización de ADN desde una solución acuosa congelada que no contiene excipientes causa la eliminación de las moléculas de agua coordinadas, es decir, una envoltura hidratada de la molécula de ADN con el resultado de la pérdida de la integridad estructural de la molécula de ADN (Poxon S. W., Hughes J. A., The effect of lyophilization on plasmid DNA activity, Pharm Dev Technol., 5(1):115-22 (2005)). Las consecuencias de la conformación dañada de una molécula de ADN, que incluyen la degradación de los enlaces complementarios entre las bases de nitrógeno y la degradación parcial del apilamiento puede tener como resultado eventos no deseados, es decir, una disminución de la actividad biológica del ADN del plásmido de hasta un 25% con respecto a la actividad original (Anchordoquy T. J., Armstrong T. K., Molina M. C., Low molecular weight dextrans stabilize nonviral vectors during lyophilization at low osmolalities: concentrating suspensions by rehydration to reduced volumes, J Pharm Sci., 94(6):1226-36 (2005)). Se sabe que es posible compensar la pérdida de las moléculas de agua coordinadas eliminadas por sublimación mediante la adición de sustancias hidrófilas no volátiles, tales como azúcares y polioles a la solución liofilizada (Maitani Y., Aso Y., Yamada A., Yoshioka S., Effect of sugars on storage stability of lyophilized liposome/DNA complexes with high transfection efficiency, Int J Pharm., 356(1-2):69-75 (2008)). En una gran parte de los procedimientos conocidos en el campo de la estabilización de ADN por liofilización se utilizan liposomas liofilizados que contienen ADN (patente EE.UU. 7.323.297), y por tanto, la susceptibilidad de aplicación de las soluciones conocidas para una solución que contiene ADN del plásmido desnudo es cuestionable.

En el estudio de Quaak S., Haanen J., Beijnen J., y Nuijen B., Naked Plasmid DNA Formulation: Effect of Different Disaccharides on Stability after Lyophilisation, AAPS PharmSciTech, Vol. 11, No. 1 (March 2010)), se examine el efecto de diversos polisacáridos en la liofilización de ADN del plásmido y se estableció que la sacarosa, que se utiliza con ADN en una relación de masa de 20:1, proporcionó la forma de dosificación más estable para el almacenamiento. El estudio no consideró el efecto del pH y la solución salina en la estabilidad del ADN del plásmido, ni estudió composiciones de soluciones de ADN isotónicas a concentraciones por debajo de 5 mg/ml ni estudió monosacáridos como posibles candidatos potenciales para su uso en la obtención de preparaciones macromoleculares liofilizadas estables.

Sumario

La invención queda definida con las reivindicaciones.

Un objeto de la presente divulgación concierne a una cepa productora de ADN del plásmido y a una composición farmacéutica fisiológicamente viable que proporciona estabilidad a la forma de dosificación acabada del ADN del plásmido durante un período de tiempo prolongado y que se puede utilizar para genoterapia.

Una cepa productora de ADN del plásmido *Escherichia coli* es la cepa TOP10/pCMV-VEGF165, que comprende el plásmido pCMV-VEGF165 y produce ADN superenrollado del plásmido pCMV-VEGF165 cuando se cultiva en un medio, habiéndose depositado la cepa en la Russian Collection of Agricultural Microorganisms en el All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RCAM ARRIAM RAAS con el número de acceso 517.

Una composición farmacéutica comprende una preparación del ADN del plásmido purificado que codifica un factor de crecimiento del endotelio vascular bajo el control de elementos genéticos funcionales que proporcionan expresión genética en células humanas, y una cantidad efectiva de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para proporcionar una solución isotónica, siendo el al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable al menos un crioprotector que es un vehículo, un estabilizador del pH o una combinación de los mismos, estando comprendida la concentración del ADN del plásmido purificado entre 0,1 y 10 mg/ml, y oscilando el pH de la composición entre 7,0 y 9,0. La composición se podría utilizar para la inducción del crecimiento del tejido vascular de la sangre.

Otro objeto es un procedimiento de almacenamiento del ADN del plásmido purificado que codifica el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) que comprende la adición de una solución de al menos un crioprotector al ADN del plásmido purificado, obteniendo en virtud de ello una solución isotónica, a continuación, la liofilización de la solución isotónica y el almacenamiento del liofilizado a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C, siendo la concentración del ADN del plásmido purificado antes de la liofilización de 0,1 a 10 mg/ml, y siendo el pH de la solución isotónica de 7,0 a 9,0.

La composición farmacéutica se puede utilizar para la preparación de una solución para inyecciones que tienen por objeto la administración intramuscular, intravenosa o intraarterial, subcutánea e intradérmica. Se puede utilizar para administración cutánea en forma de gel para implantarla sobre un vehículo reabsorbible o no reabsorbible.

La composición farmacéutica tiene por objeto la preparación extemporánea de la solución, o de otro modo, para administración intramuscular o cualquier otra administración endógena a un sujeto (paciente, persona lesionada, animal) para inducir el desarrollo del tejido de los vasos sanguíneos.

La composición farmacéutica está indicada terapéuticamente entre otros para afecciones isquémicas de diversa etiología, incluyendo una enfermedad cardíaca coronaria, enfermedades arteriales ocluyentes crónicas de las extremidades inferiores, situaciones que requieren procesos de reparación de tejido para corrección por ejemplo heridas persistentes de importancia (úlceras), incluyendo quemaduras, lesiones locales, incluyendo fracturas y defectos.

Otro objeto es un procedimiento para la aplicación de la composición farmacéutica que comprende la aplicación de una cantidad efectiva de la composición farmacéutica para proporcionar un efecto terapéutico dependiendo de la forma nosológica y la indicación médica a un sujeto humano.

Breve descripción de los dibujos

Se podrá tener una apreciación más completa de los modos de realización y de muchas de las ventajas que conlleva, una vez que se comprendan mejor haciendo referencia a la siguiente descripción detallada cuando se considere en relación con los dibujos adjuntos, en los que:

La Figura 1 muestra el mapa de expresión del plásmido pCMV-VEGF165 (la longitud es 4859 pares de bases). Se utilizan las siguientes abreviaturas: "región de promotor/potenciador temprano de CMV" – una región de promotor/potenciador de genes tempranos de citomegalovirus; una región de potenciador; "un promotor de CMV" – una región de promotor de citomegalovirus "caja TATA" – un elemento TATA; "inicio de la transcripción" – un punto del inicio de la transcripción; "Kozak" – una secuencia Kozak, "codón de inicio" – el primer codón del marco de lectura abierto de VEGF165; "VEGF165" – el marco de lectura abierto de polipéptido (ORF) del factor de crecimiento del endotelio vascular humano 165; "codón de parada"; "pA term SV40" – una señal de poliadenilación y terminación de virus SV40; "cebador directo de CMV" – la región de hibridación del cebador directo de CMV patrón; "cebador M13 directo 20" – la región de hibridación del cebador M13 directo 20 patrón; "cebador direct. M13 pUC" – la región de hibridación del cebador directo patrón M13 pUC; "ori pBR322" – la

región de origen de la replicación de plásmido pBR322; "origen f1" – la región de origen de la replicación de bacteriófago f1; "promotor AmpR" promotor procariota del gen bla; "NTPII" –neomicin fosfotransferasa; "KanR" – la secuencia que codifica aminoglicósido-3'-fosfotransferasa que proporciona resistencia bacteriana a kanamicina. Las flechas muestran las direcciones de la transcripción génica, los números del primer y último fragmento de nucleótido aparecen entre paréntesis. Los sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción aparecen en cursiva y los nucleótidos en los puntos de corte se dan en entre paréntesis.

La Figura 2 presenta un angiograma de un paciente de 74 años de edad con isquemia crónica de la extremidad inferior. Diagnóstico: aterosclerosis, fase IIb-III de enfermedad oclusiva femoropoplítea bilateral (dolor en reposo). Valores de admisión: índice tobillo-branquial – 0,48 (derecho), 0,32 (izquierdo), presión transcutánea parcial de oxígeno – 61 mm Hg. El paciente recibía una terapia física como parte del tratamiento complejo normal (dextranos, disgregantes). Valores a 90 días: distancia de caminata – 130 m; índice tobillo-branquial – 0,5 (derecha), 0,57 (izquierda), presión transcutánea parcial de oxígeno – 78 mm Hg. A, B – angiogramas antes del tratamiento: tercio superior y central del muslo (A); caña de la pierna (B); C, D – angiogramas a 90 días tras la administración de Neovasculgen como parte de la terapia compleja: tercio superior y central del muslo (C); caña de la pierna (D). Los vasos sanguíneos cargados satisfactoriamente se indican con flechas incluyendo los vasos colaterales en vías de evolución.

Descripción detallada

Los materiales, procedimientos y ejemplos son meramente ilustrativos, no pretendiéndose que sean exhaustivos, a no ser que se especifique de otro modo. El ADN del plásmido que codifica un factor de crecimiento del endotelio vascular se puede obtener por ligación del marco de lectura abierto (ORF) del ADNc VEGF con un vector del plásmido que proporciona expresión de genes codificados en células humanas, así como la replicación del plásmido en células *Escherichia coli*. Ejemplos de vectores pueden ser plásmidos pcADN, pCMV-Script y pBK-CMV (fuente: base de datos electrónica en Hypertext Transfer Protocol://addgene.org/vector-database/). Un componente necesario del vector es un promotor eucariota. A título de ejemplo no exhaustivo de promotores se incluyen, pero sin limitarse sólo a ellos, el promotor/potenciador de citomegalovirus (CMV) temprano, el promotor del factor de elongación 1 alfa de traducción humano (EF1a), promotor de ubiquitina C (Ubc) humana, promotor de virus vacuolizante de simio (SV40), promotor fosfoglicerato kinasa 1 murina (PGK) y promotor de beta actina humana. Un grupo de vectores de más preferencia para la expresión del VEGF está constituido por vectores adecuados para células humanas que contienen el promotor de citomegalovirus inmediatamente temprano (en adelante promotor CMV), un gen de resistencia a antibiótico y una región para un origen de replicación que proporciona el número de copias de plásmido moderado o alto que puede ser por ejemplo el origen de replicación de ColE1, pUC, pBR322, o p15A. Un grupo de mayor preferencia de vectores incluye un gen que proporciona resistencia a antibiótico kanamicina que codifica neomicin fosfotransferasa (NPT II) que permite excluir el uso de antibióticos del grupo ampicilina del proceso de generación de un plásmido. Como vectores para obtener el ADN del plásmido diana, se podrían utilizar plásmidos que codifican un marco de lectura abierto (ORF) de otros genes. El ADN del plásmido diana se puede obtener de dichos ADN por eliminación de una región ORF de un gen heterólogo con el uso de endonucleasas de restricción, aislamiento del fragmento de ADN aceptor y su posterior ligación con el fragmento de ADN donador que codifica el ORF del VEGF de ADNc humano. Un ejemplo del plásmido aceptor puede ser el plásmido pEGFP-N2. Una región del marco de lectura abierto del ADNc VEGF humano se puede seleccionar por ejemplo de cuatro variantes de corte y empalme que codifican isoformas de VEGF que tienen una longitud de 121, 145, 165, o 189 aminoácidos. Una isoforma de VEGF de mayor preferencia para obtener ADN del plásmido es la variante de corte y empalme que tiene una longitud de 165 aminoácidos. La región de ORF del ADNc VEGF humano se puede derivar del ADNc total del tejido humano o sintetizar de los oligonucleótidos que se solapan.

En la parte sintética del ORF del ADNc VEGF humano, se puede reemplazar una parte o todos los codones por codones degenerados. El fragmento sintético de ADNc puede sustituir la región natural si proporciona un tiempo de vida de ADNc y una eficacia de la traducción del gen diana comparables a los del fragmento natural. El ADNc del VEGF que se utiliza para obtener un plásmido diana puede contener un polimorfismo conocido (sustitución de nucleótidos aislados) que no cambie la composición de aminoácidos del polipéptido codificado. El uso de ADNc del VEGF que contiene dicho polimorfismo no cambia las propiedades del plásmido diana derivado. Un plásmido que codifica VEGF de mayor preferencia y que tiene por objeto el uso médico es un producto de ligación del ORF de la región de VEGF de la isoforma que tiene 165 aminoácidos y el fragmento aceptor del plásmido pBK-CMV.

El ADN del plásmido pCMV-VEGF165, que se describe en la patente rusa RU2297848 tiene una longitud de 4859 pares de base y tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1. En la figura 1, se presenta la estructura del plásmido pCMV-VEGF165.

El plásmido que tiene 4859 pares de base comprende:

1. La región entre los nucleótidos 1-361, de la secuencia entre los nucleótidos 968-4859 del vector pBKCMV, que incluye:

- 1.1. Los elementos que proporcionan expresión del gen diana de células de mamífero: la región del promotor/potenciador de CMV temprano (nucleótidos 4626 - 355) que incluye la región potenciadora (nucleótidos 4684-231) y el promotor de citomegalovirus (nucleótidos 274-355); el elemento-caja TATA

(nucleótidos 320-326); el inicio de transcripción (349); la señal de poliadenilación y el terminador de virus SV40 (nucleótidos 1306-1531); y

1.2. los elementos que mantienen la presencia del plásmido en células bacterianas, la región del inicio de la replicación de bacteriófago f1 (nucleótidos 1583-1995); el promotor procariota del gen bla (nucleótidos 2058-2086); la secuencia que codifica aminoglucosido-3'-fosfotransferasa que proporciona resistencia bacteriana a kanamicina (nucleótidos 2519-3313); y la región de la replicación de plásmido de pBR322 (nucleótidos 3907-4526);

2. La región entre los nucleótidos 362-967, que incluye la secuencia Kozak (nucleótidos 380-391) que está localizada en torno al codón de inicio del gen diana y proporciona el inicio de la traducción de ARNm del gen diana, el marco de lectura abierto del gen que codifica VEGF 165 (nucleótidos 392-964), y el codón de parada (nucleótidos 965-967).

El plásmido contiene sitios de reconocimiento para endonucleasas de restricción NdeI (1); BamHI (364); EcoRI (373); BsrGI (854); XmaI (969); Acc65I (978); BclI (1307); NarI (2650); ApaLI (4254); y PciI (4568).

El plásmido consistió en el obtenido mediante la aplicación de procedimientos de ingeniería genética conocidos, plásmidos disponibles en el mercado y regiones clonadas de ADNc humano (Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular Cloning. 2ª ed. Nueva York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989).

Se enumeran los elementos de plásmidos con arreglo a su localización. Las posiciones mutuas de los elementos funcionales son importantes para una actividad plasmídica eficaz.

Como plásmido recombinante, de acuerdo con un objeto de la invención, se pueden utilizar diversos plásmidos que contienen el gen que codifica VEGF165 bajo el control de un promotor eucariota.

Los fragmentos de ADN que codifican los mismos elementos reguladores se pueden obtener por modificación de la secuencia de nucleótidos del fragmento de ADN (SEQ ID NO: 1), por ejemplo, con el uso de mutagénesis dirigida a sitio, en la que se pueden suprimir, insertar o añadir uno o más nucleótidos en determinados sitios. Los fragmentos de ADN modificados, tal como se han mencionado, se pueden obtener aplicando procedimientos conocidos para generar mutaciones.

Para obtener una cepa productora, se puede insertar (transformar) el ADN del plásmido pCMV-VEGF165 en una célula bacteriana, preferentemente en una bacteria de *Escherichia* sp. susceptible de dicha transformación de plásmido. La selección de las células transformadas no es crucial, ya que los procedimientos y enfoques de transformación son conocidos. Si bien puede variar la abundancia y el contenido total del plásmido pCMVVEGF165 en la suspensión bacteriana dependiendo del tipo de célula y las condiciones de cultivo de los transformantes obtenidos, el plásmido diana suele estar presente siempre y cuando se logre la transformación de la célula receptora.

La transformación celular con plásmido implica la introducción del plásmido en una célula aplicando procedimientos conocidos. Entre los procedimientos de transformación se incluye por ejemplo el procedimiento descrito en Jac A. Nickoloff, Electroporation Protocols for Microorganisms (Methods in Molecular Biology) // Humana Press; 1ª edición (15 de agosto, 1995).

De acuerdo con un modo de realización "una célula bacteriana productora del plásmido CMV-VEGF165" incluye una célula bacteriana que tiene la capacidad de mantener, replicar y acumular el plásmido CMV-VEGF165 cuando se cultiva la célula bacteriana en un medio de cultivo. La expresión "célula bacteriana productora del plásmido pCMV-VEGF165" significa una célula que es capaz de acumular el plásmido pCMV-VEGF165 a 1 mg/l como mínimo (o 1 mg/10⁹ células), y más preferentemente, a 10 mg/l como mínimo. El plásmido pCMV-VEGF165 se acumula en una célula, preferentemente, en una forma cíclica superenrollada.

Preferentemente, se podrían utilizar las bacterias de *Escherichia* sp. para la transformación con el plásmido pCMV-VEGF165 que codifica el gen VERFR bajo el control del promotor de CMV. El tipo de promotor no está limitado en particular y podría ser un promotor activo en los miocitos, los fibroblastos y el endotelio, como por ejemplo SV40 o EF-1.

El término "bacteria *Escherichia*" significa que la bacteria incluye la especie *Escherichia* con arreglo a la clasificación conocida en microbiología. Como ejemplo de microorganismo que pertenece a la especie *Escherichia*, se puede mencionar la bacteria *E. coli*.

La especie de *Escherichia* que se podría utilizar para la transformación no está limitada, describiéndose ejemplos no exhaustivos de bacterias para la transformación en el libro de Neidhardt, F.C. y col. (*Escherichia coli* ADN *Salmonella typhimurium*, American Society for Microbiology, Washington D.C., 1208, Tabla 1)

Las cepas receptoras preferibles para la producción de plásmido pCMV-VEGF165 son cepas *E.coli* derivadas de la cepa no patógena K12 que contiene un gen inactivado recA1 del sistema de reparación de ADN, así como un gen inactivado de endonucleasa endA1. Entre los ejemplos de dichas cepas se incluyen DH5alpha, DH10B, XL-1Blue, y TOP10.

Entre los ejemplos de cepa receptora para la producción del plásmido pCMV-VEGF165 se incluye, sin limitarse sólo a ella, *Escherichia coli* TOP10. La cepa *Escherichia coli* TOP10 se caracteriza por los signos morfológicos, fisiológicos y bioquímicos de cultivo, así como por los rasgos genéticos que se describen a continuación.

- 5 La cepa *Escherichia coli* TOP10/pCMV-VEGF165 ha sido depositada en la Russian Collection of Agricultural Microorganisms en el All-Russia Research Institute for Agricultural Microbiology RCAM ARRIAM RAAS (ARRIAM, 3 Podbelsky chausse, San Petersburgo, Pushkin 8, 196608, RU), el 24 de febrero de 2009, y se le ha concedido el número de acceso 517.

- 10 Particularidades morfológicas de cultivo de *Escherichia coli* TOP10: son bacilos gram negativos que forman hebras; en un medio agar – forma colonias de bordes uniformes moderados, convexos, semi-transparentes, lúcidos. La cepa se almacena en el medio Luria-Bertrani que contiene glucosa al 1% y glicerol al 10%. La cepa se cultiva en el medio Luria Bertrani.

Las particularidades genéticas de la cepa *Escherichia coli* TOP10 son: genotipo de la cepa - $\Delta(\text{araA-leu})7697$, [araD139]B/r, 55 $\Delta(\text{codB-lacI})3$, $\phi 80\text{dlacZ58(M15)}$, galK0, mcrA0, galU-, recA1, endA1, nupG-, rpsL-(strR), $\Delta(\text{mcrC-mrr})715$.

- 15 La transformación de la cepa *Escherichia coli* TOP10 con el plásmido pCMV-VEGF165 tiene como resultado la producción de la cepa productora TOP10/pCMV-VEGF165 que proporciona la biosíntesis del plásmido pCMV-VEGF165 en la cantidad de 5-20 mg/l, cuando se cultiva en matraces con agitación durante 12-20 horas en el medio Luria Bertrani con la adición de hasta 30 $\mu\text{g/ml}$ de kanamicina, estando al menos un 70% del plásmido pCMV-VEGF165 presente en forma superenrollada.

- 20 Un procedimiento para la preparación del plásmido pCMV-VEGF165 altamente purificado incluye el cultivo de las bacterias antes mencionadas en un medio de cultivo adecuado para el crecimiento de las células procariotas transformadas; la selección de biomasa celular; la resuspensión de las células; la realización de lisis alcalina de las células; la renaturalización selectiva del ADN del plásmido con una solución ácida; la separación del sedimento precipitado, la concentración por ultrafiltración; la separación de las impurezas extrañas y ARN por filtración con gel
- 25 en una solución que tiene una alta concentración de sal (p.ej. salina), la separación de ADN genómico residual, endotoxina e impurezas relacionadas por cromatografía de afinidad (tiofilica); la purificación final por cromatografía de intercambio aniónico y posterior concentración; y desalación de la solución del plásmido purificado pCMV-VEGF165 con ultrafiltración/diafiltración.

- 30 La preparación derivada del plásmido pCMV-VEGF165, que es adecuada para la posterior producción de una composición farmacéutica y una forma de dosificación acabada, se caracteriza por las siguientes propiedades:

- 1) Proporción de impurezas relacionadas (formas cíclica relajada y lineal del plásmido) – no superior a 5% (en adelante –la proporción de la concentración del principio activo).
- 2) Proporción de ADN genómico de *E.coli* – no más de 1%.
- 3) Proporción de ARN – no más de 1 %.
- 35 4) Proporción del total de proteínas – no más de 0,1%.
- 5) Contenido en endotoxina – no más de 50 EU/1 mg del principio activo.

- 40 Se puede preparar una solución del ADN del plásmido pCMV-VEGF165 adecuada para la posterior producción de una composición farmacéutica y una forma de dosificación acabada aplicando otros procedimientos conocidos para el aislamiento y purificación de ADN, por ejemplo, aplicando un procedimiento de lisis térmica de bacterias en presencia de un detergente, un procedimiento de precipitación de ARN selectivo con cloruro de calcio, un procedimiento para la separación de las formas relajada y superenrollada del plásmido con elución en gradiente y otros procedimientos descritos, p.ej. en D.M.F. Prazeres, "Plasmid Biopharmaceuticals: Basics, Applications ADN Manufacturing", John Wiley & Sons, Inc., (2011) ISBN: 978-0-470-23292-7.

- 45 Una forma de dosificación acabada del ADN del plásmido pCMV-VEGF165 debería ser adecuada para inyecciones intramusculares y no debería cambiar significativamente las propiedades del principio activo durante el almacenamiento a largo plazo. Una posible forma de dosificación acabada del plásmido pCMV-VEGF165 incluye, pero sin limitarse solo a ellos, una solución congelada, una solución líquida, un liofilizado, es decir una solución secada por congelación, y una película amorfa.

- 50 En un modo de realización, la composición farmacéutica comprende una preparación de ADN del plásmido purificado, que codifica un factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) bajo el control de elementos genéticos funcionales que proporciona expresión genética en células humanas y una cantidad efectiva de al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable para proporcionar una solución isotónica, consistiendo dicho al menos un excipiente farmacéuticamente aceptable en al menos un crioprotector que es un vehículo, un estabilizador del pH o una combinación de los mismos, siendo la concentración del ADN del plásmido de 0,1 a 10 mg/ml, y el pH de la
- 55 composición de 7,0 a 9,0.

En otro modo de realización, la composición farmacéutica comprende ADN del plásmido purificado y una cantidad efectiva de glucosa y fosfato sódico para formar una solución isotónica para inyecciones, siendo el pH de la composición 7,8.

- 60 En otro modo de realización diferente más, el pH de la composición está comprendido entre 7,2 y 8,5, preferentemente entre 7,4 y 8,2.

En otro modo de realización, la composición comprende ADN del plásmido purificado, de 200 a 400 mM de glucosa y de 3 a 30 mM de fosfato sódico.

En un modo de realización diferente, la composición farmacéutica comprende de 0,8 a 1,2 mg/ml del ADN del plásmido purificado pCMV-VEGF165, de 280 a 320 mM de dextrosa; y de 8 a 12 mM de fosfato sódico, siendo el pH de la composición de 7,4 a 8,2.

Una variante de más preferencia de la forma de dosificación acabada es una solución líquida o un liofilizado, ya que se pueden almacenar a temperaturas positivas, es decir, en los refrigeradores farmacéuticos normales, y no requieren un período de tiempo prolongado para preparar inyecciones.

Una variante de mayor preferencia aún de la forma de dosificación es un liofilizado, ya que la ausencia de agua retarda potencialmente las reacciones químicas de degradación de la cadena de ADN que tienen como resultado de una conversión del ADN del plásmido superenrollado en una forma cíclica relajada. Además, cuando se almacena una forma de dosificación líquida del ADN del plásmido, puede producirse un contacto prolongado de la solución y el material del sello de goma, pudiendo contener potencialmente el sello de goma iones extraíbles de metales de transición que pueden acelerar la degradación de las cadenas de ADN al catalizar la formación de radicales hidroxilo.

La preparación del liofilizado, es decir, una masa porosa amorfa o microcristalina, requiere la presencia de excipientes en la solución que se va a liofilizar que actúan como crioprotector, estabilizador del pH, agente quelante, antioxidante y/o vehículo. El conjunto de excipientes mínimo posible puede incluir al menos un crioprotector, que tiene propiedades de vehículo, un estabilizador de pH, o una combinación de los mismos. Un excipiente que consiste en un crioprotector y un vehículo puede ser al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en un mono- y un disacárido, un poliol y un polímero, por ejemplo, seleccionado del grupo que consiste en sacarosa, lactosa, trehalosa, manitol, sorbitol, glucosa, rafinosa, polivinil pirrolidona, y una combinación de los mismos. El estabilizador de pH puede ser al menos un componente seleccionado del grupo que consiste en citrato sódico, fosfato sódico, Tris-HCl, Tris-acetato, glicina, metionina, arginina, histidina y otros aminoácidos.

Al estudiar diversas composiciones farmacéuticas del ADN del plásmido pCMV-VEGF165, el autor de la invención ha descubierto de manera sorprendente que la mayor estabilidad en las condiciones de almacenamiento de una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C, se conseguía con una combinación de excipientes, tales como glucosa y fosfato sódico, a un pH de 7,8.

Cuando el volumen de una solución es el mismo antes y después de la liofilización, la composición más óptima de la solución que proporciona propiedades conservadas del ADN del plásmido pCMV-VEGF165 en el proceso de liofilización y almacenamiento más prolongado son las siguientes:

1. La concentración del ADN del plásmido es de 0,1 a 10 mg/ml, preferentemente de 0,5 a 4 mg/ml, y más preferentemente de 0,8 a 1,2 mg/ml.

2. La concentración de glucosa (dextrosa) es de 200 a 400 mM, preferentemente de 250 a 350 mM, más preferentemente de 280 mM a 320 mM.

3. La concentración de fosfato sódico (una mezcla de fosfato monosódico, disódico y trisódico) es de 3 a 30 mM, preferentemente de 5 a 20 mM, y más preferentemente de 8 to 12 mM.

4. El pH de la solución es de 7,0 a 9,0, preferentemente de 7,2 a 8,5, y más preferentemente de 7,4 a 8,2.

En la Figura 1 se presenta la estructura del plásmido utilizado para la preparación de una cepa productora y una composición farmacéutica.

Otro objeto de la invención es un procedimiento para el almacenamiento de ADN del plásmido purificado que codifica un factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) que comprende la adición de una solución de al menos un crioprotector al ADN del plásmido purificado, obteniendo en virtud de ello una solución isotónica, a continuación, la liofilización de la solución isotónica, y el almacenamiento del liofilizado a una temperatura comprendida entre +2 °C y +8 °C, siendo la concentración del ADN del plásmido purificado antes de la liofilización de 0,1 a 10 mg/ml, y siendo el pH de la solución de la solución isotónica de 7,0 a 9,0.

En un modo de realización, al menos un crioprotector es glucosa y la relación de masas de la glucosa con respecto al ADN del plásmido purificado en la solución isotónica es 1:50.

En un modo de realización diferente, al menos un crioprotector es glucosa y la proporción del ADN del plásmido relajado en el liofilizado almacenado durante 3 meses no supera el 10%.

En otro modo de realización más, al menos un crioprotector es fosfato sódico, estando comprendido el contenido de fosfato sódico entre 5 y 20 mM y el pH de la solución isotónica entre 7,8 y 9,0.

Otro objeto de la invención es un procedimiento para el uso de la composición farmacéutica que comprende el uso de una cantidad efectiva de la composición farmacéutica para proporcionar un efecto terapéutico dependiendo de la forma nosológica y la indicación médica, a un sujeto humano.

Una vez descrito de forma general el objeto de la presente invención, se podrá comprender con mayor profundidad haciendo referencia a ciertos ejemplos específicos que se facilitan en el presente documento con un mero fin ilustrativo no pretendiéndose que sean exhaustivos. Es apropiado dar ejemplos sobre la posible implantación de la preparación del ADN del plásmido pCMV-VEGF165 de la presente divulgación.

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de una solución del ADN del plásmido purificado pCMV-VEGF165.

Preparación de inóculos

- 5 Se recuperó un vial de inóculos conservados de la cepa productora TOP10/ pCMV-VEGF165 del banco de trabajo y se cultivó el inóculo en 50 ml de medio líquido.

Biosíntesis de ADNp

- 10 Se preparó un fermentador con un matraz de 10 litros, se esterilizó el matraz con un medio, se fijaron asépticamente líneas de entrega y retirada, se calibró un equipo de medición de parámetros de conexión, se inoculó el fermentador y se cultivó durante 8 horas hasta que se consiguió una concentración constante de oxígeno disuelto (fase de crecimiento de cultivo estacionario), con una velocidad fija de la mezcladora de 1000 rev/min, tras lo cual se detuvo la ventilación y se enfrió el matraz. Se transfirió una muestra de una suspensión de cultivo para el análisis de la densidad de cultivo.

Producción de biomasa

- 15 Se separó la biomasa, es decir, el sedimento de células, desde el líquido de cultivo en una centrifuga intermitente de alta velocidad de suelo con un rotor de ángulo fijo. Se transfirió el sobrenadante del líquido de cultivo a u autoclave para desinfección y neutralización. Se guardó la biomasa obtenida en bolsas para centrifuga a una baja temperatura en un refrigerador. Se transfirió una muestra de la biomasa para analizar el contenido y la integridad de la sustancia diana.

Suspensión de la biomasa, lisis y neutralización

- 20 Se transfirió la biomasa descongelada a un recipiente de lisis y se suspendió con un agitador de hélice en una solución en suspensión. Se llevó a cabo la lisis celular con una solución de hidróxido sódico y dodecil sulfato de sodio con mezclado con el agitador de hélice durante 5 minutos. Al mismo tiempo que se mezclaba, se añadió una solución de acetato potásico para neutralización y la formación simultánea del precipitado de residuos celulares, ADN genómico unido a histonas y proteínas. Se formó el precipitado como resultado de la transformación de dodecil sulfato de sodio en una sal potásica insoluble y la coagulación de micelos. Al mismo tiempo, la neutralización de la solución tuvo como resultado la renaturalización del ADN del plásmido.

Preparación de lisina aclarada

- 30 Se transfirió la suspensión obtenida a bolsas para centrifugación y se separó el precipitado en una centrifuga intermitente de alta velocidad de suelo con un rotor de ángulo fijo. Se transfirió el sobrenadante del líquido de cultivo a un autoclave para desinfección y neutralización. Se recogió la solución aclarada del ADN del plásmido que también contenía compuestos relacionados – la forma lineal y relajada del ADN del plásmido, así como impurezas extrañas, tales como ADN genómico residual; ARN, proteínas y endotoxinas detectadas por LAL en el vaso de alimentación de un equipo de ultrafiltración.

Ultrafiltración

- 35 Se concentró la solución del ADN del plásmido por ultrafiltración en el flujo tangencial con cartuchos de fibra hueca con el valor umbral límite de 500 kDa. Como parte de la ultrafiltración, tuvo lugar también una eliminación adicional 9 veces de las moléculas con un tamaño inferior a 3 kDa, p.ej., eliminación de proteínas, ARN de transporte, endotoxina LAL y fragmentos cortos de ADN genómico. Se concentró la solución con un factor de concentración de 9. Se recogió la solución de plásmido concentrada en un vial de cristal, se lavó la unidad de filtración con una solución para filtración en gel y se combinó con la solución concentrada del ADN del plásmido.

Filtración en gel

- 45 Se llevó a cabo un primer proceso de purificación cromatográfica a fondo por filtración en gel sobre un material absorbente de dextrina de poro grueso Flujo Rápido de Sepharose 6 "GE Life Sciences". Se utilizó una solución que tenía una alta concentración de sal que contenía 2,1 M de sulfato de amonio y 10 mM de EDTA-Na que permitió separar las moléculas según su tamaño y retuvo las impurezas de ARN y LAL endotoxina con el absorbente como consecuencia de la interacción hidrofoba no específica. Se recogieron la solución con impurezas y las soluciones de lavado en un vaso y se eliminaron en su momento. Se recogió la solución de ADN del plásmido purificado que contenía 2,1 M de sulfato de amonio en un recipiente de vidrio.

Cromatografía de afinidad

- 50 Se llevó a cabo un segundo proceso de purificación cromatográfica a fondo por cromatografía tiofílica (pseudo- afin) sobre un material absorbente PlasmidSelect Xtra "GE Lifesciences". Para lavar la columna, se utilizó una solución que contenía 2,0 M de sulfato de amonio y se aplicó la solución semi-purificada a una columna con una

concentración de sulfato de amonio 2,1 M. Cuando se aplicó la solución, todas las formas de ADN y la proporción de ADN residual fueron absorbidas por el material absorbente, no absorbiéndose las proteínas residuales ni la endotoxina. Tras la aplicación, se lavó la columna con una solución de sulfato amónico que tenía una concentración 2,0 M, eluyéndose el ADN residual, el ADN genómico y las composiciones relacionadas del ADN del plásmido. Se eluyó el principio activo HSCI-01 con una solución de sulfato de amonio que tenía una concentración de 1,7 M. Se regeneró la columna y se purificó con una solución de hidróxido sódico que tenía una concentración de 0,1 M. Se recogieron la solución de impurezas y las soluciones de lavado en un recipiente y se eliminaron en su momento. Se recogió una solución de ADN del plásmido semi-purificado que contenía 1,7 M de sulfato de amonio en un recipiente de vidrio y se diluyó con agua para inyecciones en una relación 1:2.

10 **Cromatografía de intercambio aniónico**

Se llevó a cabo un tercer proceso de purificación cromatográfica a fondo por cromatografía de intercambio aniónico sobre un material absorbente SOURCE 30Q "GE Lifesciences". Se absorbió el principio activo en una columna y se aclaró con una solución que contenía 0,4 M de cloruro sódico. Cuando se lavó la columna, se sustituyó un catión del principio activo del ion amonio por ion sodio y se eluyó la endotoxina residual. Se eluyó el principio activo con una solución de cloruro sódico 1 M. Se recogieron la solución que contenía impurezas y la solución de lavado en un recipiente y se eliminaron en su momento. Se recogió la solución del ADN del plásmido purificado en un recipiente de vidrio.

Ultrafiltración y diafiltración

Se concentró la solución del ADN del plásmido purificada por ultrafiltración en un equipo con un módulo de fibra hueca con un valor umbral límite de 300 kDa. Cuando se alcanzó la concentración de 0,25%, se conectó el equipo en modo diafiltración y se realizó un cambio de tampón completo con agua para inyección. Se recogió el filtrado en un recipiente y se eliminó en su momento. Se vertió el filtrado en un recipiente de vidrio y se midió la concentración del ADN del plásmido superenrollado a una temperatura por debajo de 70 °C.

Ejemplo 2. Producción de variantes de liofilizado para estudios de estabilidad

Para obtener variantes de la composición farmacéutica, se utilizaron una solución sin sal del ADN del plásmido pCMV-VEGF165 que tenía una concentración de aproximadamente 2,5 mg/ml y un contenido residual de Tris-HCl, pH 7,5, y no más de 1 mM NaCl. Como crioprotectores se añadieron glucosa, sacarosa y lactosa que satisficieron los requisitos mínimos de la Farmacopea Europea. Como estabilizador de pH se utilizó una solución de fosfato sódico que tenía un pH comprendido entre 7,2 y 9,0. Se utilizó un sacárido a la concentración final de 300 mM y fosfato sódico a la concentración final de 10 mM. Dichas concentraciones de excipientes proporcionaron isotonicidad a la solución para administración endógena. La concentración de ADN final de la composición farmacéutica obtenida fue 1 mg/ml.

Se llevó a cabo la liofilización en viales de vidrio de 5 ml que estaban equipados con sellos de goma de liofilización semi-abiertos y se cargaron con 1,2 ml de soluciones de ensayo. En la Tabla 1, a continuación, se muestra el régimen del secado de liofilización para todas las muestras de ensayo.

Tabla 1. Régimen de secado de liofilización

Etapas	Duración, min.	Temperatura, °C
1) Congelación de la solución		
a)	30	-50
b)	300	-50
2) Liofilización:		
a)	60	-30
b)	930	-30
c)	60	-10
d)	480	-10
e)	60	20
f)	360	20
3) Secado final:		
a)	60	40
b)	600	40

La presión de la cámara de operaciones en el proceso de secado fue 60 µbar, la temperatura de producto una vez completada la etapa de congelado no deberá ser superior a menos 45 °C, es decir., 2 grados C por debajo de la

temperatura de transición al vidrio (T_g) de la glucosa y más de 10 grados C por debajo de la T_g de todos los azúcares. La temperatura de producto tras la liofilización no deberá ser inferior a 15 °C. Se midió la temperatura de los productos con termopares congelados en los viales con simuladores de producto que contenían todos los excipientes, excepto ADN. Tras el secado final, se presurizaron los viales en una atmósfera de aire seco estéril con compresión de batería. Se cerraron los viales sin cargar con tapones de aluminio.

Para comparar la estabilidad del producto al almacenarlo a una temperatura elevada, se utilizó una solución de fosfato sódico que tenía un pH de 7,8 que se obtuvo mezclando soluciones de fosfato disódico y monosódico en una relación molar de 91,5:8,5. Se almacenaron los viales cerrados liofilizados a +37°C en un termostato seco, retirándose un grupo de viales una vez al mes, se disolvió el liofilizado y se midió una proporción del ADN del plásmido relajado por cromatografía de intercambio iónico analítico. En la Tabla 2, se presentan los resultados de la medida.

Tabla 2. Proporción de ADN del plásmido relajado almacenado a una temperatura elevada

Crioprotector	Tiempo de retención, meses			
	0	1	2	3
Glucosa	2,2%	2,8%	5,3%	10,0%
Sacárido	2,1%	6,2%	8,4%	10,4%
Maltosa	2,3%	7,0%	8,8%	14,6%
Lactosa	2,2%	9,0%	9,6%	18,5%

Se estableció que la glucosa utilizada como crioprotector proporcionó la velocidad de degradación más baja para el ADN del plásmido superenrollado en una relación de masas del sacárido con respecto al ADN de 1:50 y un pH = 7,8.

En lo que se refiere a la composición farmacéutica que contenía glucosa, se investigó la relación entre la estabilidad del ADN del plásmido superenrollado y el pH de la solución y la concentración de fosfato sódico (pH 7,8). Se estableció que la estabilidad del ADN del plásmido superenrollado no había cambiado significativamente para varias concentraciones de fosfato sódico desde 5 a 20 mM (no se muestran los datos). Para diversos pH de la solución, se demostró (véase Tabla 3) que no se produjeron cambios significativos en la estabilidad para el intervalo de pH comprendido entre 7,8 y 9,0, pero la estabilidad del ADN del plásmido superenrollado descendió para un pH 7,2.

Tabla 3. Proporción de ADN del plásmido relajado almacenado a una temperatura elevada para varios niveles de pH

pH	0 meses	1 mes	2 meses	3 meses
7,2	2,2%	4,09%	7,63%	15,17%
7,8	2,2%	2,80%	5,30%	10,00%
8,4	2,3%	2,76%	3,34%	10,69%
9	2,1%	2,51%	2,97%	8,39%

Por tanto, de acuerdo con los datos de almacenamiento acelerado, se puede seleccionar una composición farmacéutica cuando el pH de la composición es de 7,8 a 9,0 y la concentración de fosfato sódico es de 5 a 20 mM. En lo que se refiere a la concentración de los grupos fosfato ionizados en el ADN, con una concentración de ADN de 1 mg/ml, es aproximadamente 3 mM, y la concentración de sales tampón debería exceder significativamente la concentración total de grupos ionizados en el principio activo; la concentración óptima de fosfato sódico se seleccionó en 10 mM. El pH óptimo de la solución fue 7,8, ya que dicho valor es el más próximo al pH fisiológico (7,2-7,4). Sin embargo, se debería tener en cuenta que el pH tendría que estar lo más cercano posible a 7,2 y que cuanto más alto es el nivel de pH, mayor es la estabilidad del plásmido (hasta 9,0). Probablemente, el ADN del plásmido conserva su estabilidad a una temperatura de almacenamiento comprendida entre +2 y +8°C y a un pH de 7,0 a 9,0, que es suficiente para genoterapia.

Ejemplo 3. Formulación de una solución del ADN del plásmido purificado y producción de la forma de dosificación acabada

Se obtuvo el ADN del plásmido, tal como se muestra en el Ejemplo 1, antes de finalizada la etapa de cromatografía de intercambio aniónico. Se llevaron a cabo las siguientes etapas, tal como se describe a continuación.

5 Ultrafiltración y diafiltración

Se concentró una solución del ADN del plásmido purificado por ultrafiltración en un equipo con un módulo de fibra hueca con un valor umbral límite de la membrana de 300 kDa. Cuando se alcanzó la concentración de 0,15%, se conectó el equipo en modo diafiltración y se llevó a cabo un cambio total del tampón por una solución de fosfato sódico que tenía una concentración de 10 mM y un pH 7,8 con un contenido de 4,4% (300 mM) de glucosa en agua para inyección. Se recogió el filtrado en un recipiente y se eliminó en su momento. Se vertió la solución formulada concentrada en un recipiente de vidrio, se midió la concentración del ADN del plásmido superenrollado y se llevó la solución a la concentración final de ADN de 0,1%.

Filtración estéril

Se transfirió la solución del principio activo final a un área limpia de clase A y se llevó a cabo la filtración estéril con un filtro de membrana de disco en recipientes de 250 ml estériles despirogenizados para soluciones de infusión según la norma GOST 19808-86. Se seleccionaron las muestras destinadas al departamento de control de calidad, se cerraron los recipientes con sellos de goma, a continuación, se cerraron con tapones de aluminio y se congelaron en una zona de cuarentena en un almacén.

Se descongeló la solución formulada de una solución del ADN del plásmido y se transfirió a un área limpia clase A. Se abrieron los recipientes y se llevó a cabo la filtración estéril con filtros de membrana de disco para recipientes de 250 ml estériles despirogenizados para soluciones de infusión con arreglo a la norma GOST 19808-86. Se vertió la solución en condiciones estériles en viales de insulina de 5 ml estériles con arreglo a la norma GOST 19808-86. Se cerraron los viales con sellos de goma con arreglo a TU 38.006.269-90 y se transfirieron para la liofilización.

Se colocaron los viales sobre las rejillas del liofilizador, se congelaron a -45 °C y se realizó el secado al vacío en 3 etapas. Se colocaron sellos, se retiraron los viales y se cerraron con tapones de aluminio con arreglo a la norma GOST P 51314-99.

Ejemplo 4. Verificación de la estabilidad de la forma de dosificación acabada e pCMV-VEGF165

Se almacenaron viales con el liofilizado estéril del ADN del plásmido pCMV-VEGF165 en un refrigerador farmacéutico a +4 °C durante 2,5 años y se llevó a cabo el análisis de la proporción de impurezas relacionadas por cromatografía de intercambio aniónico una vez cada 6 meses. En la Tabla 4 se presentan los resultados del análisis.

Tabla 4. Estabilidad de la forma de dosificación acabada guardada a una temperatura de +4 °C

Patrón	Salida	6 meses	12 meses	18 meses	24 meses	30 meses
Menos de un 5% de ADN del plásmido lineal y relajado inferior según HPLC de intercambio iónico	3,0%	3,0%	3,3%	3,7%	4,1%	4,0%

Por lo tanto, la forma de dosificación del ADN del plásmido pCMV-VEGF165 fue estable por lo menos durante dos años.

35 Ejemplo 5. Verificación de la eficacia de la composición farmacéutica

Se confirmó la eficacia del tratamiento con una composición farmacéutica que contenían excipientes además de la construcción de plásmido en pacientes con isquemia crónica de las extremidades inferiores, es decir, los resultados del tratamiento con la composición farmacéutica que contenía los excipientes fueron inesperadamente superiores a los del tratamiento con una composición que incluía únicamente el plásmido (monoterapia). Se determinó la mayor eficacia de tratamiento en un estudio en el que participaron 75 pacientes con isquemia crónica de las extremidades inferiores (estadio 2a-3 de acuerdo con A.V. Pokrovsky-Fontaine (A.V. Pokrovsky, 2004; Inter-Society Consensus for the Management of Peripheral Arterial Disease (TASC II). Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg., oxygen pressure, ankle-brachial index ADN a linear blood flow rate in the posterior tibial artery).

Distancia de caminata. Al cabo de 3 meses de tratamiento, la distancia de caminata de los pacientes del grupo clínico era 236.49 ± 193.49 m (distancia promedio), y a los 6 meses - 284.73 ± 242.02 m (distancia promedio) (de 20 a 1500 m de todas las distancias obtenidas). El aumento de la distancia media que pudo caminar un paciente sin

dolor fue 149,47 m en el grupo de estudio, habiéndose incrementado la media en 127,5 m y siendo estadísticamente significativa la diferencia entre valores ($p=0,006$).

En el grupo de control, la distancia media que pudo caminar un paciente sin dolor descendió 1,42 m, la mediana había aumentado 35,00 m, y la diferencia entre valores no fue estadísticamente ($p=0,6$). Las diferencias en la dinámica de los valores entre los grupos (+150,89 para el valor medio y +92,5 para la mediana) fueron estadísticamente significativos ($p=0,001$).

Presión transcutánea de oxígeno. En el grupo clínico, se observó la tendencia de un aumento estable del valor medio de la presión transcutánea de oxígeno ($TcPO_2$) de $76,69 \pm 69,96$ mm Hg en la primera visita a $85,42 \pm 10,87$ mm Hg en la cuarta visita. El grupo de control presentó la dinámica contraria, es decir, hubo un descenso del valor medio de $76,89 \pm 55,76$ mm Hg a $75,37 \pm 61,57$ mm Hg para el mismo período de observación. Las diferencias observadas entre los valores en el grupo de clínico fueron significativas y la diferencia en el grupo de control no fue significativa ($p=0,096$), es decir, los valores de los pacientes no habían cambiado prácticamente como parte del tratamiento normal. Las diferencias registradas en los valores $TcPO_2$ medios incrementados entre los grupos (+10,25) y la mediana (+8,00) fueron estadísticamente significativos ($p=0,0001$). El aumento relativo de los valores en los grupos fue: $+12,40 \pm 17,69\%$ en el grupo clínico y $2,12 \pm 4,38\%$ en el grupo de control ($p=0,001$).

Índice tobillo branquial. El ITB de la extremidad inferior diana presentó una tendencia a aumentar en los pacientes del grupo clínico y a descender en los pacientes del grupo de control. Por lo tanto, en el grupo clínico, había aumentado el valor basal $0,513 \pm 0,182$ durante la terapia 0,057 y fue 0,57 a los seis meses. La diferencia observada de los valores entre las visitas cuarta y primera en el grupo clínico fue significativa ($p=0,001$). En el grupo de control, el índice había aumentado en 0,02 unidades a los seis meses, es decir, de $0,458 \pm 0,182$ a $0,438 \pm 0,187$. Sin embargo, los cambios no fueron significativos ($p=0,5$).

La diferencia entre los valores ITB medios incrementados entre los grupos fue +0,077 (mediana +0,065), las diferencias registradas fueron significativas.

Velocidad del flujo sanguíneo lineal (de acuerdo con sonografía de ultrasonido de la arteria tibial posterior). En los pacientes del grupo clínico, el valor presentó la tendencia a aumentar durante el período de estudio: el valor medio había aumentado 8,24 cm/seg, la mediana 5,0 cm/seg, es decir, de $14,95 \pm 10,19$ cm/seg hasta $23,19 \pm 12,71$ cm/seg en seis meses.

En los pacientes del grupo de control, el valor había aumentado 1,30 cm/seg (de $17,60 \pm 6,60$ cm/seg al comienzo del estudio, hasta $18,90 \pm 6,77$ cm/seg a los seis meses), mientras que la mediana no había cambiado, es decir, estaba al nivel de 20,0 cm/seg. Durante el estudio, las diferencias entre los grupos fueron estadísticamente significativas ($p=0,005$).

Los valores medios en el grupo clínico habían aumentado en mayor grado en comparación con los valores que presentó el grupo de control (+6,94 cm/seg), igual que la mediana (+5,00 cm/seg); la diferencia en los valores fue estadísticamente significativa ($p=0,005$).

Por tanto, teniendo en cuenta el criterio de eficacia de la "distancia de caminata sin dolor", los valores habían aumentado de manera significativa en los pacientes de 135,3 m en la primera visita a 248,7 m a los seis meses (un aumento del 110,5%) que significativamente diferente de la tendencia que presentó el grupo de control ($p=0,001$).

Criterios de eficacia adicionales:

- ITB – incrementado en un 11,11% ($p=0,001$);
- $TcPO_2$ – incrementada en un 11,38% ($p=0,001$);
- VFSL- incrementada en un 55,12% ($p=0,001$).

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> "Nextgen" Company Limited

<120> UNA COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA PARA LA ESTIMULACIÓN DE ANGIOGÉNESIS.

<130> NCOL001PEP

<140> EP 13832746.5

<141> 02-08-2013

<150> RU 20120137126

<151> 31-08-2012

<150> PCT/RU 2013/000669

<151> 02-08-2013

<160> 2

<170> PatentIn versión 3.5

5 <210> 1
<211> 4859
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

10 <220>
<223> Expresión del plásmido

<220>
<221> Exón
15 <222> (392)..(964)

<400> 1

tatgccaaagt acgcccccta ttgacgtcaa tgacggtaaa tggcccgccct ggcattatgc	60
ccagtacatg accttatggg actttcctac ttggcagtag atctacgtat tagtcatcgc	120
tattaccatg gtgatgcggt tttggcagta catcaatggg cgtggatagc ggtttgactc	180
acggggattt ccaagtctcc accccattga cgtcaatggg agtttgtttt ggcacaaaaa	240
tcaacgggac tttccaaaat gtcgtaacaa ctccgccccca ttgacgcaaa tgggcggtag	300
gcgtgtacgg tgggaggtct atataagcag agctggttta gtgaaccgtc agatccgcta	360
gtggatccaa agaattcggg cctccgaaac c atg aac ttt ctg ctg tct tgg	412
Met Asn Phe Leu Leu Ser Trp	
1 5	
gtg cat tgg agc ctt gcc ttg ctg ctg tac ctg cac cat gcc aag tgg	460
Val His Trp Ser Leu Ala Leu Leu Leu Tyr Leu His His Ala Lys Trp	
10 15 20	
tcc cag gct gca ccc atg gca gaa gga gga ggg cag aat cat cac gaa	508
Ser Gln Ala Ala Pro Met Ala Glu Gly Gly Gly Gln Asn His His Glu	
25 30 35	
gtg gtg aag ttc atg gat gtc tat cag cgc agc tac tgc cat cca atc	556
Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln Arg Ser Tyr Cys His Pro Ile	
40 45 50 55	

ES 2 621 675 T3

gag acc ctg gtg gac atc ttc cag gag tac cct gat gag atc gag tac	604
Glu Thr Leu Val Asp Ile Phe Gln Glu Tyr Pro Asp Glu Ile Glu Tyr	
60 65 70	
atc ttc aag cca tcc tgt gtg ccc ctg atg cga tgc ggg ggc tgc tgc	652
Ile Phe Lys Pro Ser Cys Val Pro Leu Met Arg Cys Gly Gly Cys Cys	
75 80 85	
aat gac gag ggc ctg gag tgt gtg ccc act gag gag tcc aac atc acc	700
Asn Asp Glu Gly Leu Glu Cys Val Pro Thr Glu Glu Ser Asn Ile Thr	
90 95 100	
atg cag att atg cgg atc aaa cct cac caa ggc cag cac ata gga gag	748
Met Gln Ile Met Arg Ile Lys Pro His Gln Gly Gln His Ile Gly Glu	
105 110 115	
atg agc ttc cta cag cac aac aaa tgt gaa tgc aga cca aag aaa gat	796
Met Ser Phe Leu Gln His Asn Lys Cys Glu Cys Arg Pro Lys Lys Asp	
120 125 130 135	
aga gca aga caa gaa aat ccc tgt ggg cct tgc tca gag cgg aga aag	844
Arg Ala Arg Gln Glu Asn Pro Cys Gly Pro Cys Ser Glu Arg Arg Lys	
140 145 150	
cat ttg ttt gta caa gat ccg cag acg tgt aaa tgt tcc tgc aaa aac	892
His Leu Phe Val Gln Asp Pro Gln Thr Cys Lys Cys Ser Cys Lys Asn	
155 160 165	
aca gac tcg cgt tgc aag gcg agg cag ctt gag tta aac gaa cgt act	940
Thr Asp Ser Arg Cys Lys Ala Arg Gln Leu Glu Leu Asn Glu Arg Thr	
170 175 180	
tgc aga tgt gac aag ccg agg cgg tgacccgggt ggggtaccag gtaagtgtac	994
Cys Arg Cys Asp Lys Pro Arg Arg	
185 190	
ccaattcgcc ctatagttag tcgtattaca attcactggc cgtcgtttta caacgtcgtg	1054
actgggaaaa ccctggcggt accccaactt aatcgcccttg cagcacatcc cccttttcgc	1114
cagctggcgt aatagcgaag agggccgcaa cgaatcgccc cttcccaaca gttgcgcaag	1174
cctgaatggc cgaatggaga tccaattttt aagtgtataa tgtgttaaac tactgattct	1234
aattgtttgt gtattttaga ttcacagtcc caaggctcat ttcaggcccc tcagtcctca	1294
cagtctgttc atgatcataa tcagccatac cacatttgta gaggttttac ttgctttaaa	1354
aaacctccca cacctcccc tgaacctgaa acataaaatg aatgcaattg ttgttggttaa	1414
cttgttttatt gcagcttata atggttacaa ataaagcaat agcatcacia atttcacaaa	1474
taaagcattt ttttactgc attctagttg tggtttgtcc aaactcatca atgtatctta	1534
aggcgtaa at tgtaagcggt aatattttgt taaaattcgc gttaaatttt tgttaaatca	1594
gctcattttt taaccaatag gccgaaatcg gcaaaatccc ttataaatca aaagaataga	1654
ccgagatagg gttgagtgtt gttccagttt ggaacaagag tccactatta aagaacgtgg	1714
actccaacgt caaaggcgga aaaaccgtct atcaggggcga tggcccaacta cgtgaaccat	1774

ES 2 621 675 T3

caccctaatac	aagtttttttg	gggtcgaggt	gccgtaaagc	actaaatcgg	aacctaaag	1834
ggagcccccg	atthagagct	tgacggggaa	agccggcgaa	cgtggcgaga	aaggaaggga	1894
agaaagcgaa	aggagcgggc	gctagggcgc	tggcaagtgt	agcggtcacg	ctgcgcgtaa	1954
ccaccacacc	cgcgcgcgtt	aatgcgcgcg	tacagggcgc	gtcagggtggc	acttttcggg	2014
gaaatgtgcg	cggaacccct	atgtgtttat	ttttctaaat	acattcaaat	atgtatccgc	2074
tcatgagaca	ataaccctga	taaatgcttc	aataatattg	aaaaaggaag	agtcctgagg	2134
cggaaagaac	cagctgtgga	atgtgtgtca	gttaggggtgt	ggaaagtccc	caggctcccc	2194
agcaggcaga	agtatgcaa	gcatgcatct	caattagtca	gcaaccagggt	gtggaaagtc	2254
cccaggctcc	ccagcaggca	gaagtatgca	aagcatgcat	ctcaattagt	cagcaaccat	2314
agtcccgccc	ctaactccgc	ccatcccgcc	cctaactccg	cccagttccg	cccattctcc	2374
gccccatggc	tgactaattt	tttttattta	tgcagaggcc	gaggccgcct	cggcctctga	2434
gctattccag	aagtagtgag	gaggcttttt	tggaggccta	ggcttttgca	aagatcgatc	2494
aagagacagg	atgaggatcg	tttcgcatga	ttgaacaaga	tggattgcac	gcaggttctc	2554
cggccgcttg	ggtggagagg	ctattcggct	atgactgggc	acaacagaca	atcggctgct	2614
ctgatgccgc	cgtgttcggg	ctgtcagcgc	aggggcgcgc	ggttcttttt	gtcaagaccg	2674
acctgtccgg	tgcctgaat	gaactgcaag	acgaggcagc	gcggctatcg	tggctggcca	2734
cagcgggctg	tccttgcgca	gctgtgctcg	acgttgtcac	tgaagcggga	agggactggc	2794
tgctattggg	cgaagtgccg	gggcaggatc	tcctgtcatc	tcaccttgct	cctgccgaga	2854
aagtatccat	catggctgat	gcaatgcggc	ggctgcatac	gcttgatccg	gctacctgcc	2914
cattcgacca	ccaagcgaaa	catcgcatcg	agcagacacg	tactcggatg	gaagccggtc	2974
ttgtcgatca	ggatgatctg	gacgaagagc	atcaggggct	cgcgccagcc	gaactgttcg	3034
ccaggctcaa	ggcagcatg	cccgaaggcg	aggatctcgt	cgtgacccat	ggcagtcctt	3094
gcttgccgaa	tatcatggtg	gaaaatggcc	gcttttctgg	attcatcgac	tgtggccggc	3154
tgggtgtggc	ggaccgctat	caggacatag	cgttggctac	ccgtgatatt	gctgaagagc	3214
ttggcggcga	atgggctgac	cgttctctcg	tgttttacgg	tatcgccgct	ccgattcgc	3274
agcgcacgc	cttctatcgc	cttcttgacg	agttcttctg	agcgggactc	tggggttcga	3334
aatgaccgac	caagcgacgc	ccaacctgcc	atcacgagat	ttcgattcca	ccgccgcctt	3394
ctatgaaagg	ttgggcttcg	gaatcgtttt	ccgggaogcc	ggctggatga	tcctccagcg	3454
cggggatctc	atgctggagt	tcttcgcca	ccctaggggg	aggctaactg	aaacacggaa	3514
ggagacaata	ccggaaggaa	ccgcgcctat	gacggcaata	aaaagacaga	ataaaacgca	3574
cgggtgttgg	tcgtttgttc	ataaacgcgg	ggttcgggtc	cagggtcggc	actctgtcga	3634
tacccaccgc	agacccatt	ggggccaata	cgcgcgcgtt	tcttcctttt	ccccaccca	3694

ccccccaagt tcgggtgaag gccagggct cgcagccaac gtcggggcgg caggccctgc	3754
catagcctca ggttactcat atatacttta gattgattta aaacttcatt tttaatttaa	3814
aaggatctag gtgaagatcc tttttgataa tctcatgacc aaaatccctt aacgtgagtt	3874
ttcgttccac tgagcgtcag accccgtaga aaagatcaaa ggatcttctt gagatccttt	3934
ttttctgcgc gtaatctgct gcttgcaaac aaaaaaacca ccgctaccag cgttggtttg	3994
tttgccggat caagagctac caactctttt tccgaaggta actggcttca gcagagcgca	4054
gataccaaat actgttcttc tagtgtagcc gtagttaggc caccacttca agaactctgt	4114
agcaccgcct acatacctcg ctctgctaata cctgttacca gtggctgctg ccagtggcga	4174
taagtcgtgt cttaccgggt tggactcaag acgatagtta ccgataagg cgcagcggtc	4234
gggctgaacg gggggttcgt gcacacagcc cagcttggag cgaacgacct acaccgaact	4294
gagataccta cagcgtgagc tatgagaaag cgccacgctt cccgaaggga gaaaggcgga	4354
caggatatccg gtaagcggca gggtcggaac aggagagcgc acgagggagc ttccaggggg	4414
aaacgcctgg tatctttata gtctgtcgg gtttcgccac ctctgacttg agcgtcgatt	4474
tttgtgatgc tcgtcagggg ggcggagcct atggaaaaac gccagcaacg cggccttttt	4534
acggttcctg gccttttgct ggccttttgc tcacatgttc tttcctgcgt tatcccctga	4594
ttctgtggat aaccgtatta ccgccatgca ttagttatta atagtaatca attacgggggt	4654
cattagttca tagcccatat atggagttcc gcgttacata acttacggta aatggcccg	4714
ctggctgacc gccaacgac ccccgcccat tgacgtcaat aatgacgtat gttcccatag	4774
taacgccaat agggactttc cattgacgtc aatgggtgga gtatttacgg taaactgccc	4834
acttggcagt acatcaagtg tatca	4859

<210> 2
 <211> 191
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

ES 2 621 675 T3

Met	Asn	Phe	Leu	Leu	Ser	Trp	Val	His	Trp	Ser	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	1	5	10	15
Tyr	Leu	His	His	Ala	Lys	Trp	Ser	Gln	Ala	Ala	Pro	Met	Ala	Glu	Gly	20	25	30	
Gly	Gly	Gln	Asn	His	His	Glu	Val	Val	Lys	Phe	Met	Asp	Val	Tyr	Gln	35	40	45	
Arg	Ser	Tyr	Cys	His	Pro	Ile	Glu	Thr	Leu	Val	Asp	Ile	Phe	Gln	Glu	50	55	60	
Tyr	Pro	Asp	Glu	Ile	Glu	Tyr	Ile	Phe	Lys	Pro	Ser	Cys	Val	Pro	Leu	65	70	75	80
Met	Arg	Cys	Gly	Gly	Cys	Cys	Asn	Asp	Glu	Gly	Leu	Glu	Cys	Val	Pro	85	90	95	
Thr	Glu	Glu	Ser	Asn	Ile	Thr	Met	Gln	Ile	Met	Arg	Ile	Lys	Pro	His	100	105	110	
Gln	Gly	Gln	His	Ile	Gly	Glu	Met	Ser	Phe	Leu	Gln	His	Asn	Lys	Cys	115	120	125	
Glu	Cys	Arg	Pro	Lys	Lys	Asp	Arg	Ala	Arg	Gln	Glu	Asn	Pro	Cys	Gly	130	135	140	
Pro	Cys	Ser	Glu	Arg	Arg	Lys	His	Leu	Phe	Val	Gln	Asp	Pro	Gln	Thr	145	150	155	160
Cys	Lys	Cys	Ser	Cys	Lys	Asn	Thr	Asp	Ser	Arg	Cys	Lys	Ala	Arg	Gln	165	170	175	
Leu	Glu	Leu	Asn	Glu	Arg	Thr	Cys	Arg	Cys	Asp	Lys	Pro	Arg	Arg	180	185	190		

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica que comprende:

una preparación del ADN del plásmido purificado pCMV-VEGF165 que codifica un factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF) bajo el control de elementos genéticos funcionales que proporcionan expresión génica en células humanas,
3-30 mM de fosfato sódico y de 200 a 400 mM de glucosa para proporcionar una solución isotónica, y en la que la concentración del ADN del plásmido purificado es de 0,1 to 10 mg/ml, y el pH de la composición es de 7,4 a 9,0.

2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1 para su uso en el tratamiento de una afección isquémica incluyendo isquemia de extremidad inferior aterosclerótica, enfermedad cardíaca coronaria, enfermedades arteriales ocliterantes crónicas de extremidad inferior, o para su uso en el tratamiento de heridas o úlceras seleccionadas del grupo que consiste en: heridas, úlceras, heridas persistentes y úlceras, quemaduras lesiones locales, fracturas de hueso y defectos.

3. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, que comprende el ADN del plásmido purificado y una cantidad efectiva de glucosa y fosfato sódico para formar una solución isotónica para inyección, siendo el pH de la composición 7,8.

4. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, teniendo la composición las siguientes características:

- a) el pH de la composición es de 7,4 a 8,2;
- b) la concentración del ADN del plásmido purificado es de 0,5 a 4 mg/ml, preferentemente de 0,8 a 1,2 mg/ml.

5. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 4, comprendiendo dicha composición:

de 0,8 a 1,2 mg/ml del ADN del plásmido purificado pCMV-VEGF165;
de 280 a 320 mM de dextrosa; y
de 8 a 12 mM de fosfato sódico,

en la que el pH de la composición es de 7,4 a 8,2.

6. La composición farmacéutica de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el ADN del plásmido purificado pCMV-VEGF165 tiene la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO: 1.

7. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que como mínimo un 70% del ADN del plásmido purificado está presente en una forma superenrollada.

8. La composición farmacéutica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-2, en la que la preparación del ADN del plásmido purificado comprende:

no más de 5% de impurezas seleccionadas del grupo que consiste en:

una forma cíclica relajada, una forma de plásmido lineal, y una mezcla de las mismas,
no más de 1% de ADN genómico,
no más de 1% de ARN,
no más de 0,1% del total de proteínas, y
no más de 50 EU de una endotoxina por 1 mg de principio activo.

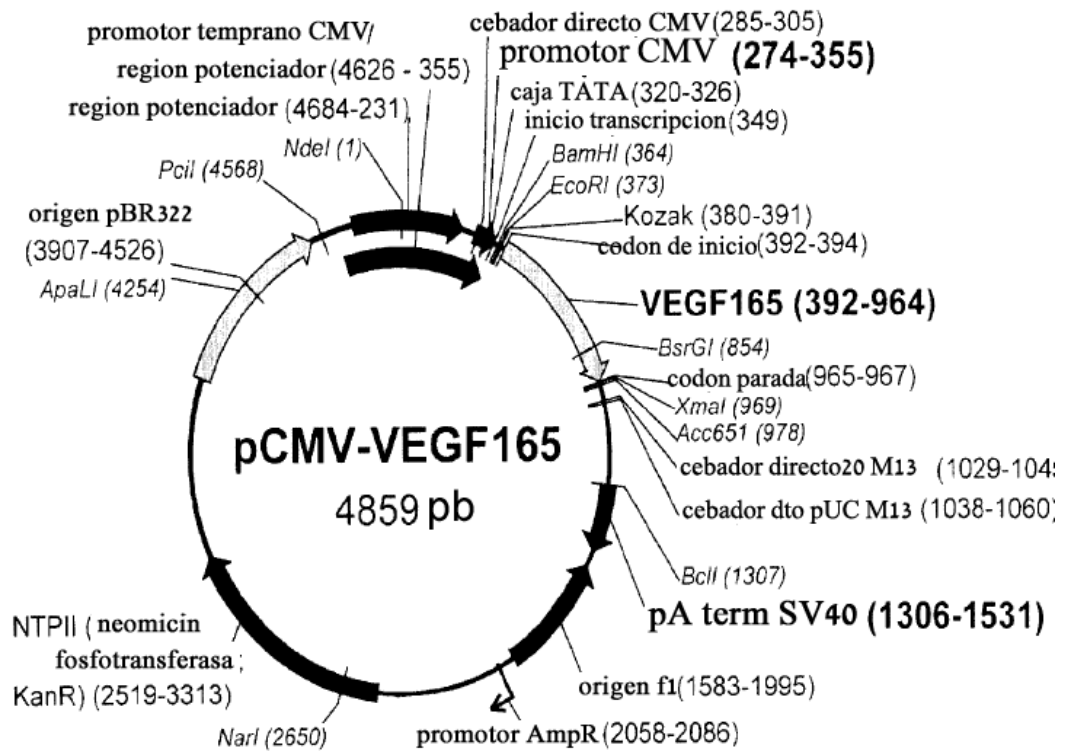


Fig.1

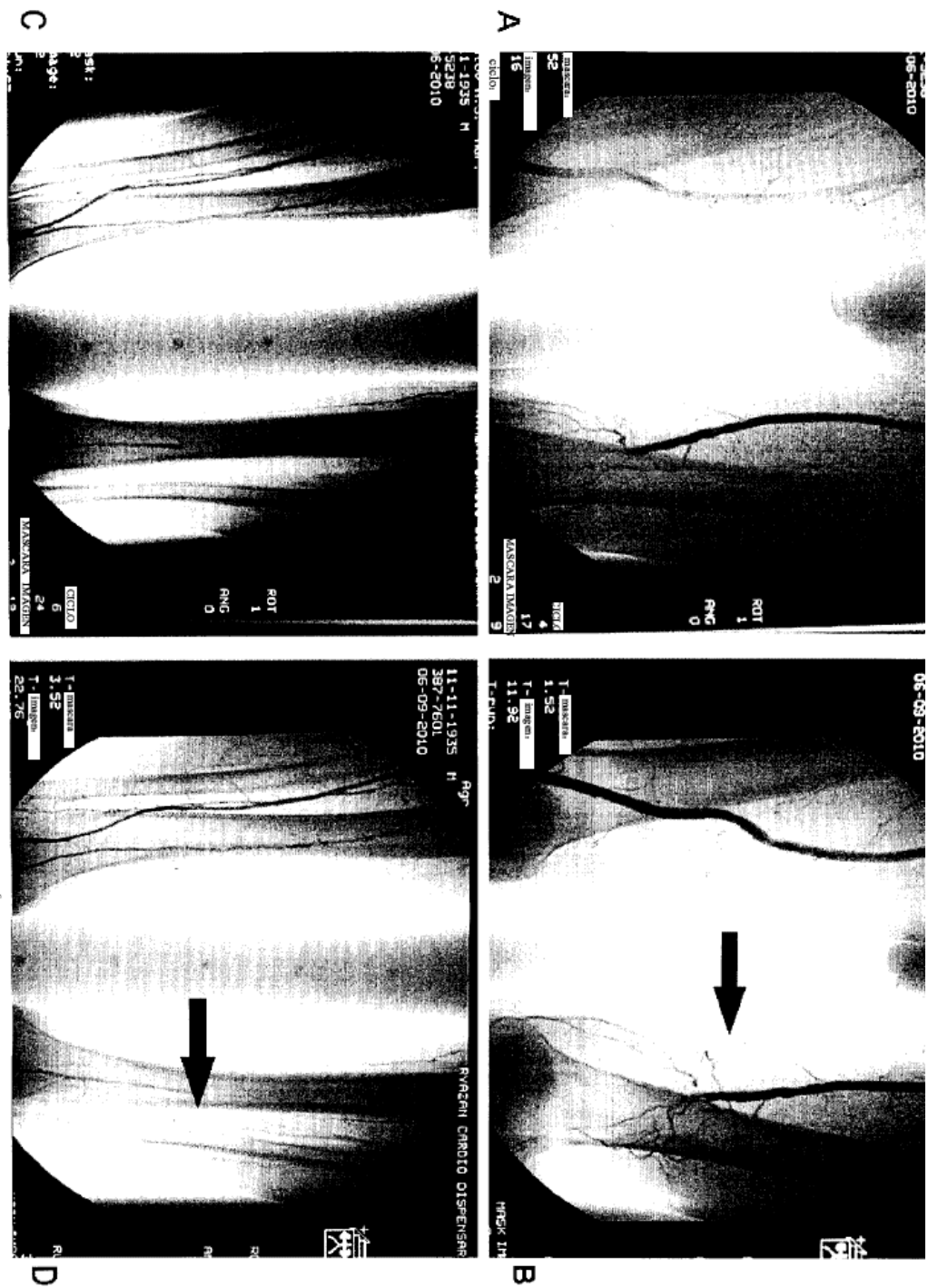


Fig.2