

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 660 846**

51 Int. Cl.:

A61K 48/00 (2006.01)

A61K 31/7088 (2006.01)

C07H 21/00 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/87 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **26.09.2008 PCT/CA2008/001714**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.04.2009 WO09039657**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.09.2008 E 08833604 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.12.2017 EP 2195035**

54 Título: **Composiciones poliplex de quitosano-ácido nucleico de alta concentración**

30 Prioridad:

28.09.2007 US 976316 P

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

26.03.2018

73 Titular/es:

**ENGINE, INC. (100.0%)
7171 Frederick-Banting
Montreal, QC H4S 1Z9, CA**

72 Inventor/es:

**HSU, ERIC C.;
FLEET, CARLOS;
CHEUNG, ANTHONY y
GAO, JUN**

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 660 846 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

Composiciones poliplex de quitosano-ácido nucleico de alta concentración

5 Campo

La invención se refiere a poliplex de quitosano-ácido nucleico homogéneos. La invención se refiere además a métodos para concentrar poliplex de quitosano-ácido nucleico en solución, y a preparaciones altamente concentradas poliplex de quitosano-ácido nucleico homogéneos.

10

Antecedentes

El quitosano es un copolímero catiónico no tóxico de N-acetil-D-glucosamina y D-glucosamina. El quitosano puede formar un complejo con ácido nucleico y se ha usado como vehículo de administración de ADN para transfectar

15

Existe dificultad para producir una solución concentrada de complejos de ácido quitosano-ácido nucleico. El aumento de las concentraciones de quitosano y ácido nucleico en una solución de mezcla conduce a la precipitación, así como a una variación indeseable en el tamaño de los complejos de quitosano-ácido nucleico así producidos. Además, el aumento de la concentración de complejos de quitosano-ácido nucleico en una solución preparada conduce a la agregación de complejos y la precipitación de la solución.

20

Se ha descrito el uso de mezcla de flujo concurrente para producir partículas uniformes que comprenden ADN y agentes de condensación (por ejemplo, carbohidratos policatiónicos) (documento U.S. 6,537.813). Para producir tales partículas, la solución de ADN y la solución de agente de condensación pueden introducirse concurrentemente y por separado en un mezclador de flujo continuo que comprende un mezclador estático o dinámico que proporciona la mezcla y la formación de partículas. Se informa que es importante mantener la proporción adecuada de ADN y agente condensante a lo largo de los procesos de introducción y mezclado y una desviación significativa de la neutralidad de carga puede conducir a una condensación incompleta o a una agregación de partículas en el

25

30

Resumen de la invención

Los presentes inventores han superado obstáculos en el campo para producir composiciones poliplex de quitosano-ácido nucleico concentradas, que encuentran muchas aplicaciones en investigación y medicina. En realizaciones preferidas, las composiciones comprenden poliplex de tamaño uniforme que no se agregan ni precipitan a pesar de una alta concentración, y exhiben estabilidad en una variedad de condiciones. Además, las composiciones preferidas de la invención también son isotónicas tal como se forman. Alcanzar la isotonicidad, mientras se mantiene la estabilidad de poliplex, es altamente deseable para aplicaciones farmacéuticas y terapéuticas. Además, los inventores han descubierto métodos para producir poliplex de quitosano-ácido nucleico mediante procesos de mezcla en línea que no requieren mezcladores estáticos o dinámicos y se mejoran por la no inclusión de estos. Además, estos métodos se pueden usar para preparar poliplex estables que tienen una carga (es decir, potencial zeta) que se aleja significativamente de neutral. Sorprendentemente, los inventores también han encontrado que el tamaño de partícula y la uniformidad se pueden controlar alterando volúmenes de materia prima para mezcla en línea sin alterar la proporción de mezcla de ADN a quitosano o alterando sustancialmente las concentraciones de ADN y quitosano en una solución de mezcla.

35

40

45

Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona composiciones que comprenden poliplex de quitosano-ácido nucleico hidratados. Las composiciones están altamente concentradas en poliplex de quitosano-ácido nucleico, que tienen una concentración de ácido nucleico mayor que aproximadamente 0.5 mg/ml, en donde la composición está sustancialmente libre de poliplex precipitado.

50

En una realización preferida, la composición es una dispersión que comprende partículas de poliplex de quitosano-ácido-nucleico.

55

En una realización preferida, la composición es isotónica. En otras realizaciones, la composición puede ser hipertónica o hipotónica.

60

En una realización preferida, la composición tiene una concentración de ácido nucleico de al menos aproximadamente 0.6 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 0.75 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 1.0 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 1.2 mg/ml, y más preferiblemente al menos aproximadamente 1.5 mg/ml.

65

La composición comprende un inhibidor de agregación que es azúcar, preferiblemente sacarosa.

En una realización preferida, la composición comprende una concentración de contra anión de menos de aproximadamente 80 mM, más preferiblemente menos de aproximadamente 60 mM, más preferiblemente menos de aproximadamente 40 mM, más preferiblemente menos de aproximadamente 20 mM. Preferiblemente, el contra anión es ion acetato.

5 En una realización preferida, los poliplex de quitosano-ácido nucleico de la composición tienen un índice de polidispersidad promedio ("PDI") de menos de aproximadamente 0.5, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.4, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.3, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.2.

10 En una realización preferida, los poliplex tienen una proporción N:P de al menos aproximadamente 2:1, más preferiblemente al menos aproximadamente 5:1, más preferiblemente al menos aproximadamente 10:1, más preferiblemente al menos aproximadamente 15:1, más preferiblemente al menos aproximadamente de 20:1.

15 En una realización preferida, los poliplex comprenden moléculas de quitosano que tienen en promedio menos de aproximadamente 3000, más preferiblemente menos de aproximadamente 2000, más preferiblemente menos de aproximadamente 1500, más preferiblemente menos de aproximadamente 1000, más preferiblemente menos de aproximadamente 500, más preferiblemente menos de aproximadamente 100, más preferiblemente menos de aproximadamente 50 unidades monoméricas de glucosamina.

20 En una realización preferida, los poliplex comprenden quitosano que tiene un peso molecular promedio de menos de aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 250 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 150 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 100 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 50 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 25 kDa.

25 En una realización preferida, los poliplex de la composición tienen un diámetro promedio de menos de aproximadamente 750 nm, más preferiblemente menos de aproximadamente 500 nm, más preferiblemente menos de aproximadamente 250 nm, más preferiblemente menos de aproximadamente 200 nm, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 150 nm.

30 En una realización preferida, la composición consiste esencialmente en poliplex de quitosano-ácido nucleico y un inhibidor de agregación.

35 En un aspecto, la invención proporciona métodos como se definió en las reivindicaciones para concentrar dispersiones poliplex de quitosano-ácido nucleico. Los métodos comprenden proporcionar una dispersión no concentrada poliplex de quitosano-ácido nucleico y concentrar la dispersión no concentrada poliplex de quitosano-ácido nucleico usando medios de concentración, preferiblemente filtración de flujo tangencial, para producir una dispersión concentrada poliplex de quitosano-ácido nucleico. Preferiblemente, la dispersión no concentrada comprende un inhibidor de agregación. Este proceso de concentración aumenta sustancialmente la concentración de los complejos de quitosano-ácido nucleico mientras se mantiene sustancialmente la concentración de moléculas pequeñas (por ejemplo, inhibidor de la agregación) dando como resultado una composición que se concentra en complejos de quitosano-ácido nucleico.

45 En una realización preferida, los medios de concentración concentran la dispersión en al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 6 veces, más preferiblemente al menos 7 veces, más preferiblemente al menos 8 veces, más preferiblemente al menos 9 veces, y lo más preferiblemente al menos 10 veces.

50 El inhibidor de la agregación es un azúcar, preferiblemente sacarosa.

55 En una realización preferida, la dispersión no concentrada poliplex de quitosano-ácido nucleico comprende contra anión, preferiblemente ion acetato, y los medios de concentración no concentran selectivamente el contra anión. El enriquecimiento de contra anión no es tan grande como el enriquecimiento de ácido nucleico en la dispersión concentrada. Preferiblemente, la dispersión concentrada tiene una concentración de contra anión no sustancialmente mayor que la de la dispersión no concentrada.

60 En una realización preferida, la concentración de ácido nucleico en la dispersión concentrada es al menos aproximadamente 0.5 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 0.6 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 0.75 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 1.0 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 1.2 mg/ml, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 1.5 mg/ml.

65 En una realización preferida, la mezcla en línea se usa para preparar la dispersión no concentrada poliplex de quitosano-ácido nucleico.

- 5 En una realización preferida, la dispersión no concentrada tiene un volumen de al menos 10 mL, más preferiblemente al menos aproximadamente 50 mL, más preferiblemente al menos aproximadamente 500 mL, más preferiblemente al menos aproximadamente 1 L, más preferiblemente al menos aproximadamente 2 L, más preferiblemente al menos aproximadamente 3 L, más preferiblemente al menos aproximadamente 4 L, más preferiblemente al menos aproximadamente 5 L, más preferiblemente al menos aproximadamente 10 L.
- 10 En una realización preferida, los poliplex de quitosano-ácido nucleico de la dispersión no concentrada tienen una PDI promedio de menos de aproximadamente 0.5, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.4, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.3, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.2.
- 15 En una realización preferida, los poliplex de quitosano-ácido nucleico de la dispersión concentrada tienen una PDI promedio de menos de aproximadamente 0.5, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.4, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.3, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.2.
- 20 En una realización preferida, los poliplex tienen una proporción N:P de al menos aproximadamente 2:1, más preferiblemente al menos aproximadamente 5:1, más preferiblemente al menos aproximadamente 10:1, más preferiblemente al menos aproximadamente 15:1, más preferiblemente al menos aproximadamente de 20:1.
- 25 En una realización preferida, los poliplex comprenden moléculas de quitosano que tienen en promedio menos de aproximadamente 3000, más preferiblemente menos de aproximadamente 2000, más preferiblemente menos de aproximadamente 1500, más preferiblemente menos de aproximadamente 1000, más preferiblemente menos de aproximadamente 500, más preferiblemente menos de aproximadamente 100, más preferiblemente menos de aproximadamente 50 unidades monoméricas de glucosamina.
- 30 En una realización preferida, los poliplex comprenden quitosano que tiene un peso molecular promedio de menos de aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 250 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 150 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 100 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 50 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 25 kDa.
- 35 En una realización preferida, los poliplex de la composición tienen un diámetro promedio de menos de aproximadamente 750 nm, más preferiblemente menos de aproximadamente 500 nm, más preferiblemente menos de aproximadamente 250 nm, más preferiblemente menos de aproximadamente 200 nm, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 150 nm.
- 40 En un aspecto, la invención proporciona dispersiones concentradas poliplex de quitosano-ácido nucleico producidos mediante los métodos divulgados en la presente memoria.
- 45 En un aspecto, la invención proporciona métodos para modular las propiedades poliplex de quitosano-ácido nucleico formados mezclando soluciones de quitosano y ácido nucleico. En una realización, la invención proporciona métodos para modular el diámetro del poliplex de quitosano-ácido nucleico. En otra realización, la invención proporciona métodos para modular el potencial zeta del poliplex del quitosano-ácido nucleico. Los métodos implican alterar el volumen de quitosano o la solución de ácido nucleico utilizada para producir los poliplex, sin alterar la proporción de ácido nucleico a quitosano, o la concentración de ácido nucleico y quitosano en una solución de mezcla. En una realización preferida, los métodos implican la mezcla en línea de soluciones de materia prima de ácido nucleico y quitosano.
- 50 En un aspecto, la invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden poliplex de quitosano-ácido nucleico hidratados y que tienen una concentración de ácido nucleico mayor de aproximadamente 0.5 mg/ml, en donde los poliplex de quitosano-ácido nucleico comprenden una construcción de ácido nucleico terapéutico.
- 55 En una realización preferida, las composiciones farmacéuticas tienen una concentración de ácido nucleico de al menos aproximadamente 0.6 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 0.75 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 1.0 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 1.2 mg/ml, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 1.5 mg/ml.
- 60 La composición farmacéutica comprende un inhibidor de agregación que es un azúcar, preferiblemente sacarosa.
- 65 En una realización preferida, la composición farmacéutica tiene una concentración de contra anión inferior a aproximadamente 80 mM, más preferiblemente inferior a aproximadamente 60 mM, más preferiblemente inferior a aproximadamente 40 mM, más preferiblemente inferior a aproximadamente 20 mM. Preferiblemente, el contra anión es ion acetato.
- En una realización preferida, la composición farmacéutica es isotónica. En otras realizaciones, la composición farmacéutica puede ser hipertónica o hipotónica.

En un aspecto, la invención proporciona un método para preparar dispersiones de poliplex de quitosano-ácido nucleico concentradas, que comprende soluciones de quitosano y ácido nucleico en línea para formar una dispersión de quitosano-ácido nucleico no concentrada, seguido de concentración de la dispersión no concentrada de quitosano-ácido nucleico usando TFF, para producir una dispersión concentrada de poliplex de quitosano-ácido nucleico.

En una realización preferida, TFF concentra la dispersión en al menos 2 veces, más preferiblemente al menos 5 veces, más preferiblemente al menos 6 veces, más preferiblemente al menos 7 veces, más preferiblemente al menos 8 veces, más preferiblemente al menos 9 veces, y lo más preferiblemente al menos 10 veces.

En una realización preferida, la concentración de ácido nucleico en la dispersión concentrada es al menos aproximadamente 0.5 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 0.6 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 0.75 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 1.0 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 1.2 mg/ml, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 1.5 mg/ml.

En una realización preferida, la dispersión concentrada tiene una concentración de contra anión inferior a aproximadamente 80 mM, más preferiblemente inferior a aproximadamente 60 mM, más preferiblemente inferior a aproximadamente 40 mM, más preferiblemente inferior a aproximadamente 20 mM. Preferiblemente, el contra anión es ion acetato.

Preferiblemente, la dispersión concentrada comprende un inhibidor de agregación que es un azúcar, preferiblemente sacarosa.

Preferiblemente, la dispersión concentrada es isotónica. En otras realizaciones, la dispersión concentrada puede ser hipertónica o hipotónica.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1. Se muestra el dibujo esquemático de un bloque de proceso típico para la fabricación de un lote de 1 L de dispersión de poliplex de quitosano-ácido nucleico seguido de concentración de TFF.

Figura 2. Dibujo esquemático del proceso de mezcla en línea a pequeña escala. Las jeringas son de polipropileno sin látex y se pueden ampliar hasta 60 mL cada una. Dos bombas de jeringa de precisión manejan las jeringas. La tubería es de 1/16-pulgada de ID de silicona curada con platino. La unión de mezcla que se muestra es una Y, pero también puede ser una T. El material de unión de la unión es el polipropileno.

Figura 3. Dibujo esquemático del proceso de mezclado en línea de escala media para la preparación de 10L de dispersión de poliplex de quitosano-ácido nucleico. Todos los vasos se escalan en consecuencia para tamaños de lote más pequeños. El diámetro del tubo es de 0.48 cm (3/16 pulgadas). Las tasas de flujo de la bomba están indicadas para una proporción de mezcla en volumen de ADN: quitosano 2:1.

Figura 4. Plano esquemático del proceso de concentración de TFF.

Figura 5. Gráfica de resultados de transfección in vitro para poliplex producido por proceso de escala media y mezclado a diferentes velocidades.

Figura 6. Gráfica de estabilidad a temperatura ambiente para poliplex preparados por mezcla a pequeña escala con 10% de sacarosa y TFF rápida.

Figura 7. Gráfico que muestra los efectos de la alteración del volumen de materias primas de ADN y quitosano sobre el diámetro del poliplex y PDI. Controlando la proporción en volumen se controla el tamaño de partícula. Las composiciones se describen en la tabla 10. Todos los productos finales fueron N40-c75.

Descripción detallada

Por "poliplex de quitosano-ácido nucleico", "partículas de poliplex de quitosano-ácido nucleico" o "poliplex" se entiende un complejo que comprende una pluralidad de moléculas de quitosano (cada una un polímero de monómeros de glucosamina) y una pluralidad de moléculas de ácido nucleico. Los monómeros de quitosano incluyen derivados, incluido quitosano con ligando unido. Se entenderá que los "Derivados" incluyen la amplia categoría de polímeros basados en quitosano que comprenden unidades de N-acetil-D-glucosamina y/o D-glucosamina modificadas covalentemente, así como polímeros basados en quitosano que incorporan otras unidades, o unidos a otros restos. Los derivados se basan frecuentemente en una modificación del grupo hidroxilo o el grupo amina de la glucosamina. Los ejemplos de derivados de quitosano incluyen, pero sin limitación, quitosano trimetilado, quitosano PEGilado, quitosano tiolado, quitosano galactosilado, quitosano alquilado, quitosano incorporado a PEI, quitosano modificado con arginina, quitosano modificado con ácido urónico y similares. Para más

información sobre derivados de quitosano, véase, por ejemplo, pp.63-74 de "Non-viral Gene Therapy" , K. Taira, K. Kataoka, T. Niidome (editores), Springer-Verlag Tokyo, 2005, ISBN 4-431-25122-7; Zhu et al., Chinese Science Bulletin, Diciembre 2007, vol. 52(23), pp. 3207-3215; and Varma et al., Carbohydrate Polymers 55(2004) 77-93.

5 Como se usa en el presente documento, "peso promedio" de polímeros de quitosano se refiere al peso molecular promedio en peso.

Por "contra anión" se entiende un anión capaz de interacción electrostática con una amina de quitosano cargada. Los contraaniones preferidos incluyen ion acetato e ion cloruro.

10 El quitosano puede prepararse como se divulga en el documento U.S.S.N. 11/694,852 presentada el 30 de marzo de 2007, que se incorpora expresamente aquí en su totalidad como referencia. También se pueden usar derivados de quitosano, que incluyen derivados de quitosano que comprenden un resto ligando.

15 Composiciones de poliplex de Quitosano-Ácido Nucleico

En un aspecto, la invención proporciona composiciones de poliplex de quitosano-ácido nucleico, que comprenden poliplex de quitosano-ácido nucleico hidratados y estables, en donde dicha composición tiene una concentración de ácido nucleico mayor o igual a 0.5 mg/ml, y dichas composiciones está exenta de precipitado de poliplex, y además en donde dicho inhibidor es un azúcar. Como se usa en el presente documento, "sustancialmente libre" de precipitado de poliplex significa que la composición está esencialmente libre de partículas que se pueden observar en la inspección visual.

25 En una realización preferida, la composición de poliplex de quitosano-ácido nucleico tiene una concentración de ácido nucleico de al menos aproximadamente 0.6 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 0.75 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 1 mg/ml, más preferiblemente al menos aproximadamente 1.2 mg/ml, y lo más preferiblemente al menos aproximadamente 1.5 mg/ml. En una realización preferida, la composición está sustancialmente libre de ácido nucleico no complejado.

30 En una realización preferida, las composiciones de poliplex de quitosano-ácido nucleico son dispersiones. En una realización preferida, la dispersión es isotónica. Lograr la isotonicidad, mientras se mantiene la estabilidad del poliplex, es altamente deseable en la formulación de composiciones farmacéuticas, y estas composiciones preferidas son muy adecuadas para la formulación farmacéutica y las aplicaciones terapéuticas.

35 En otras realizaciones, la composición puede ser hipertónica o hipotónica.

En una realización preferida, la composición de poliplex de quitosano-ácido nucleico comprende adicionalmente un inhibidor de agregación. El inhibidor de agregación es un agente que reduce parcial o completamente la agregación y/o precipitación poliplex y proporciona la concentración poliplex de quitosano-ácido nucleico mediante medios de concentración, preferiblemente mediante el uso de filtración de flujo tangencial ("TFF"). Un inhibidor de la agregación altamente preferido es la sacarosa, aunque se pueden usar otros inhibidores de la agregación, tales como otros azúcares que son capaces de reducir la precipitación de poliplex y que proporcionan la concentración poliplex de quitosano-ácido nucleico. Los ejemplos de otros inhibidores de la agregación incluyen, pero sin limitación, trehalosa, glicerol, fructosa, glucosa y otros azúcares reductores y no reductores.

45 En una realización preferida, el inhibidor de agregación utilizado es sacarosa. La concentración de sacarosa en la dispersión de poliplex de quitosano-ácido nucleico está preferiblemente entre aproximadamente 3% y 20% en peso. Más preferiblemente, la concentración de sacarosa proporciona una composición isotónica.

50 La composición de poliplex de quitosano-ácido nucleico es preferiblemente homogénea con respecto al tamaño de poliplex. Por consiguiente, en una realización preferida, los poliplex de quitosano-ácido nucleico de la composición tienen un índice de polidispersidad promedio bajo ("PDI"). En una realización especialmente preferida, la dispersión de poliplex de quitosano-ácido nucleico tiene una PDI de menos de aproximadamente 0.5, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.4, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.3, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.2.

Los poliplex de quitosano-ácido nucleico son preferiblemente sustancialmente de tamaño estable en la composición. En una realización preferida, una composición de la invención comprende poliplex que aumentan en diámetro promedio en menos de 100%, más preferiblemente menos de 50%, más preferiblemente menos de 25%, a temperatura ambiente durante 6 horas, más preferiblemente 12 horas, más preferiblemente 24 horas, más preferiblemente 48 horas.

Los poliplex de quitosano-ácido nucleico son preferiblemente sustancialmente de tamaño estable en condiciones de enfriamiento. En una realización preferida, una composición de la invención comprende poliplex que aumentan en diámetro promedio en menos de 100%, más preferiblemente menos de 50%, más preferiblemente menos de 25%, a

2-8 grados Celsius durante 6 horas, más preferiblemente 12 horas, más preferiblemente 24 horas, más preferiblemente 48 horas.

Los poliplex de quitosano-ácido nucleico de las composiciones son preferiblemente sustancialmente de tamaño estable en condiciones de congelación-descongelación. En una realización preferida, una composición de la invención comprende poliplex que aumentan en diámetro promedio en menos de 100%, más preferiblemente menos de 50%, más preferiblemente menos de 25% a temperatura ambiente durante 6 horas, más preferiblemente 12 horas, más preferiblemente 24 horas, más preferiblemente 48 horas después de descongelación desde congelado -20 a -80 grados Celsius.

Los poliplex de quitosano-ácido nucleico comprenden un componente de ácido nucleico y un componente de quitosano. Un ácido nucleico de la presente invención generalmente contendrá enlaces fosfodiéster, aunque en algunos casos se incluyen análogos de ácido nucleico que pueden tener esqueletos alternativos u otras modificaciones o restos incorporados para cualquiera de una variedad de propósitos, por ejemplo, estabilidad y protección. Otros ácidos nucleicos análogos contemplados incluyen aquellos con esqueletos sin ribosa. Además, pueden prepararse mezclas de ácidos nucleicos naturales, análogos y ambos. Los ácidos nucleicos pueden ser monocatenarios o bicatenarios o contener porciones de ambas secuencias bicatenarias o monocatenarias. Los ácidos nucleicos incluyen, pero no se limitan a ADN, ARN e híbridos, donde el ácido nucleico contiene cualquier combinación de desoxirribo y ribonucleótidos, y cualquier combinación de bases, incluyendo uracilo, adenina, timina, citosina, guanina, inosina, xatanina hipoxatanina, isocitosina, isoguanina, etc. Los ácidos nucleicos incluyen ADN en cualquier forma, ARN en cualquier forma, que incluyen cadena triplex, dúplex o simple, antisentido, ARNsi, ribozimas, desoxirribozimas, polinucleótidos, oligonucleótidos, quimeras y derivados de los mismos.

En una realización, el componente de ácido nucleico comprende un ácido nucleico terapéutico. Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen ARN terapéuticos, que son moléculas de ARN capaces de ejercer un efecto terapéutico en una célula de mamífero. Los ARN terapéuticos incluyen ARN antisentido, ARNsi, ARN de horquilla corta y ARN enzimáticos. Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen ácidos nucleicos destinados a formar moléculas triples, ácidos nucleicos que se unen a proteínas, ribozimas, desoxirribozimas y pequeñas moléculas de nucleótidos.

Los ácidos nucleicos terapéuticos también incluyen ácidos nucleicos que codifican proteínas terapéuticas, que incluyen proteínas citotóxicas y profármacos; ribozimas; antisentido o el complemento de estos; u otras moléculas similares.

En una realización preferida, el componente de ácido nucleico comprende una construcción de ácido nucleico terapéutico. La construcción de ácido nucleico terapéutico es una construcción de ácido nucleico capaz de ejercer un efecto terapéutico. Las construcciones de ácido nucleico terapéutico pueden comprender ácidos nucleicos que codifican proteínas terapéuticas, así como ácidos nucleicos que producen transcritos que son ARN terapéuticos. Un ARN terapéutico es una molécula de ARN capaz de ejercer un efecto terapéutico en una célula de mamífero. Los ARN terapéuticos incluyen ARN antisentido, ARNsi, ARN de horquilla corta y ARN enzimáticos. Los ácidos nucleicos terapéuticos incluyen ácidos nucleicos destinados a formar moléculas triples, ácidos nucleicos que se unen a proteínas, ribozimas, desoxirribozimas y pequeñas moléculas de nucleótidos. Se puede usar un ácido nucleico terapéutico para efectuar terapia genética sirviendo como un reemplazo o potenciación para un gen defectuoso o para compensar la falta de un producto génico particular, codificando un producto terapéutico. Un ácido nucleico terapéutico también puede inhibir la expresión de un gen endógeno. Un ácido nucleico terapéutico puede codificar todo o una parte de un producto de traducción, y puede funcionar recombinándose con ADN ya presente en una célula, reemplazando así una porción defectuosa de un gen. También puede codificar una porción de una proteína y ejercer su efecto en virtud de la cosupresión de un producto génico. En una realización preferida, el ácido nucleico terapéutico se selecciona de entre los descritos en los documentos U.S.S.N. 11/694,852.

En una realización preferida, los poliplex comprenden moléculas de quitosano que tienen en promedio menos de aproximadamente 3000, más preferiblemente menos de aproximadamente 2000, más preferiblemente menos de aproximadamente 1500, más preferiblemente menos de aproximadamente 1000, más preferiblemente menos de aproximadamente 500, más preferiblemente menos de aproximadamente 100, más preferiblemente menos de aproximadamente 50 unidades monoméricas de glucosamina.

En una realización preferida, los poliplex comprenden quitosano que tiene un peso promedio de menos de aproximadamente 500 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 250 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 150 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 100 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 50 kDa, más preferiblemente menos de aproximadamente 25 kDa.

En una realización preferida, los poliplex de la composición tienen un diámetro promedio de menos de 750 nm, más preferiblemente menos de 500 nm, más preferiblemente menos de aproximadamente 250 nm, más preferiblemente menos de aproximadamente 200 nm, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente 150 nm.

En una realización, los componentes de quitosano tienen un peso molecular promedio entre 3 kDa y 250 kDa.

En una realización, los componentes de quitosano tienen un peso molecular promedio mayor que o igual a 250 kDa.

En una realización, los componentes de quitosano tienen un peso molecular promedio menor o igual a 3 kDa.

5 En una realización, los políplex de quitosano-ácido nucleico tienen una proporción N:P entre aproximadamente 2:1 y aproximadamente 100:1, más preferiblemente aproximadamente 5:1 y aproximadamente 90:1, más preferiblemente aproximadamente 10:1 y aproximadamente 90: 1.

En una realización, los políplex de quitosano-ácido nucleico tienen una proporción N:P mayor que o igual a 90:1.

10 En una realización, los políplex de quitosano-ácido nucleico tienen una proporción N:P menor que o igual a 10:1.

En una realización, los políplex de quitosano-ácido nucleico tienen un potencial zeta promedio entre +30mV y +50mV a un pH de 5.

15 En una realización, los políplex de quitosano-ácido nucleico tienen un potencial zeta promedio menor que o igual a +30mV a un pH de 5.

20 En una realización, los políplex de quitosano-ácido nucleico tienen un potencial zeta promedio mayor que o igual a +50 mV a un pH de 5.

En una realización, los políplex de quitosano-ácido nucleico tienen un diámetro promedio inferior a 225 nm.

25 En una realización, los políplex de quitosano-ácido nucleico tienen un diámetro promedio mayor que o igual a 225 nm.

En una realización, la composición tiene un pH inferior a 6.5, más preferiblemente inferior a 6.0, y lo más preferiblemente entre aproximadamente 4.5 y aproximadamente 5.5.

30 En una realización, la composición tiene un pH mayor que o igual a 6.5.

En una realización, la composición tiene un pH menor que o igual a 4.5.

35 En una realización, las moléculas de quitosano del políplex tienen un grado de desacetilación mayor que aproximadamente 70%, más preferiblemente mayor que aproximadamente 75%, más preferiblemente mayor que aproximadamente 80%, más preferiblemente mayor que aproximadamente 85%, más preferiblemente mayor que aproximadamente 90%, más preferiblemente más que aproximadamente 95%, y lo más preferiblemente al menos 98%.

40 En una realización, las moléculas de quitosano del políplex tienen un grado de desacetilación inferior o igual al 70%.

En una realización preferida, la composición consiste esencialmente en políplex de quitosano-ácido nucleico y un inhibidor de agregación. Dicha composición puede incluir contra anión y otros excipientes, por ejemplo, parabenos.

45 En otra realización preferida, la composición consiste esencialmente en políplex de quitosano-ácido nucleico. Dicha composición puede incluir contra anión y otros excipientes, por ejemplo, parabenos.

En una realización especialmente preferida, el políplex de quitosano-ácido nucleico se selecciona entre los descritos en los documentos U.S.S.N. 11/694,852.

50 **Métodos de Preparación**

En una realización preferida, se produce una composición de políplex de quitosano-ácido nucleico de alta concentración de la invención concentrando una dispersión no concentrada políplex de quitosano-ácido nucleico.

55 Una composición de políplex de quitosano-ácido nucleico no concentrada preferiblemente tiene una concentración de ácido nucleico menor de 0.5 mg/ml.

60 La dispersión no concentrada políplex de quitosano-ácido nucleico se prepara preferiblemente mediante mezclado en línea, aunque se pueden usar otros métodos, tales como formar una solución de mezclado goteando ácido nucleico o solución de quitosano en el otro. Sin embargo, la mezcla en línea proporciona la preparación de un gran volumen políplex de quitosano-ácido nucleico homogéneos, que tienen preferiblemente una PDI promedio, preferiblemente menos de 0.5, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.4, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.3, más preferiblemente menos de aproximadamente 0.2.

65

La mezcla en línea es un proceso bien conocido mediante el cual dos (o más) corrientes de fluidos se juntan en una sola corriente. La mezcla en línea se ejemplifica a continuación. Para una descripción adicional de la mezcla en línea, véanse, por ejemplo, los documentos U.S. 6,251,599 y 6,537,813, cada uno de los cuales se incorpora expresamente aquí en su totalidad como referencia.

5 Aunque se pueden usar mezcladores tales como mezcladores estáticos y mezcladores dinámicos, tales dispositivos conducen a un PDI incrementado de complejos formados por los métodos presentes. Por consiguiente, en realizaciones preferidas de la presente invención, la mezcla en línea se realiza sin el uso de tales mezcladores.

10 En la presente invención, la filtración de flujo tangencial ("TFF") es el medio preferido para concentrar una dispersión no concentrada poliplex de quitosano-ácido nucleico. En la operación TFF, se bombea una dispersión de poliplex de quitosano-ácido nucleico a través de la superficie de una membrana semipermeable mientras se aplica presión hacia la membrana para forzar una porción del fluido a través de la membrana. Las moléculas que son más pequeñas que los poros de la membrana se transportan a través de los poros de la membrana y se recogen como permeado. Los solutos permeantes incluyen, pero no se limitan a, sales, iones, azúcares y conservantes microbianos. Las entidades moleculares que son demasiado grandes para pasar a través de los poros de la membrana, incluido el poliplex de quitosano-ácido nucleico, se retienen en la corriente y se recirculan como retenido. Usando TFF, la concentración de poliplex puede aumentarse muchas veces, el resultado es una dispersión de poliplex altamente concentrada. En una realización preferida, la dispersión de poliplex altamente concentrada es isotónica.

20 En una realización preferida, una dispersión de poliplex de quitosano-ácido nucleico no concentrada comprende un azúcar, preferiblemente sacarosa. Como se describe a continuación, se encontró que la sacarosa es un inhibidor de agregación que evita la agregación de partículas durante el proceso de concentración. Adicionalmente, la sacarosa es un crioprotector eficaz, y las dispersiones de poliplex congeladas de ejemplo con una concentración de ADN de aproximadamente 1 mg/mL y que contienen hasta un 15% de sacarosa son estables durante al menos 1 mes.

El uso de TFF para concentrar poliplex de quitosano-ácido nucleico no concentrados se ejemplifica a continuación.

Alteración de las propiedades de poliplex de quitosano-ácido nucleico manipulando el volumen de materia prima

30 Se ha encontrado sorprendentemente que las propiedades poliplex de quitosano-ácido nucleico formados mezclando ácido nucleico y quitosano pueden modularse mientras se mantiene una proporción sustancialmente constante de quitosano:ácido nucleico y manteniendo una concentración de mezcla sustancialmente constante de quitosano y ácido nucleico. En particular, se ha descubierto que, alterando la proporción en volumen de las soluciones de materia prima de quitosano y ácido nucleico, las propiedades de los poliplex resultantes formados mezclando las dos soluciones pueden alterarse.

40 Por consiguiente, en un aspecto, la invención proporciona métodos para modular las propiedades poliplex de quitosano-ácido nucleico formados mezclando soluciones de quitosano y ácido nucleico. En una realización, la invención proporciona métodos para modular el diámetro de poliplex de quitosano-ácido nucleico. En otra realización, la invención proporciona métodos para modular el potencial zeta del poliplex de quitosano-ácido nucleico. Los métodos implican alterar el volumen de quitosano o la solución de ácido nucleico usada para producir los poliplex, sin alterar sustancialmente la proporción de ácido nucleico a quitosano o la concentración de ácido nucleico y quitosano en una solución de mezcla. En una realización preferida, los métodos implican la mezcla en línea de soluciones de materia prima de ácidos nucleicos y quitosano.

Formulaciones en Polvo

50 Las composiciones de poliplex de quitosano-ácido nucleico de la invención incluyen polvos. En una realización preferida, la invención proporciona una composición de poliplex de quitosano-ácido nucleico en polvo seco. En una realización preferida, la composición de poliplex de quitosano-ácido nucleico en polvo seco se produce mediante la deshidratación de una dispersión de poliplex de quitosano-ácido nucleico de la invención.

Métodos de Uso

55 Además de las aplicaciones terapéuticas, la presente invención es generalmente útil siempre que se desee la estabilización de ácido nucleico y se desee una mayor concentración de ácido nucleico (por ejemplo, para una mayor eficacia de transfección). En un entorno de laboratorio, la estabilidad del ácido nucleico es importante cada vez que se realizan procedimientos que comprometen la integridad estructural y la funcionalidad del ácido nucleico.

Formulaciones Farmacéuticas

60 La presente invención también proporciona formulaciones "farmacéuticamente aceptables" o "fisiológicamente aceptables" que comprenden composiciones de poliplex de quitosano-ácido nucleico de la invención. Dichas formulaciones se pueden administrar in vivo a un sujeto para practicar métodos de tratamiento.

Como se usa en este documento, los términos “farmacéuticamente aceptable” y “fisiológicamente aceptable” se refieren a vehículos, diluyentes, excipientes y similares que pueden administrarse a un sujeto, preferiblemente sin producir efectos secundarios adversos excesivos (por ejemplo, náuseas, dolor abdominal, dolores de cabeza, etc.). Tales preparaciones para administración incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles.

Las formulaciones farmacéuticas pueden prepararse a partir de vehículos, diluyentes, excipientes, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardantes de la absorción e isotónicos, y similares, compatibles con la administración a un sujeto. Tales formulaciones pueden estar contenidas en una tableta (recubierta o sin revestir), cápsula (dura o blanda), microperlas, emulsión, polvo, gránulo, cristal, suspensión, jarabe o elixir. También pueden estar presentes compuestos activos y conservantes suplementarios, entre otros aditivos, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes y similares.

Una formulación farmacéutica puede formularse para que sea compatible con su ruta de administración prevista. Por ejemplo, para administración oral, se puede incorporar una composición con excipientes y usar en forma de tabletas, trociscos o cápsulas, por ejemplo, cápsulas de gelatina. Se pueden incluir agentes aglutinantes farmacéuticamente compatibles y/o materiales adyuvantes en formulaciones orales. Las tabletas, píldoras, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente saborizante tal como menta, salicilato de metilo o saborizante.

Las formulaciones también pueden incluir vehículos para proteger la composición contra la degradación o eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de administración microencapsulados. Por ejemplo, se puede emplear un material de retardo tal como monoestearato de glicerilo o estearato de glicerilo solo, o en combinación con una cera.

También se contemplan supositorios y otras formulaciones administrables por vía rectal (por ejemplo., Las administrables por enema). Además con respecto a la administración rectal, véase, por ejemplo, Song et al., *Mucosal drug delivery: membranes, methodologies, and applications*, Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst., 21:195-256, 2004; Wearley, *Recent progress in protein and peptide delivery by noninvasive routes*, Crit. Rev. Ther. Drug. Carrier Syst., 8:331-394, 1991.

Se conocen en la técnica formulaciones farmacéuticas adicionales apropiadas para la administración y son aplicables en los métodos y composiciones de la invención (véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) 18ª ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., The Merck Index. (1996) 12ª ed., Merck Publishing Group, Whitehouse, NJ, y Pharmaceutical Principles of Solid Dosage Forms, Technonic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pa., (1993)).

Administración

Cualquiera de una serie de rutas de administración es posible y la elección de una ruta particular dependerá en parte del tejido objetivo. Se pueden usar jeringas, endoscopios, cánulas, tubos de intubación, catéteres y otros artículos para la administración.

Las dosis o “cantidad efectiva” para tratar un sujeto son preferiblemente suficientes para mejorar uno, varios o todos los síntomas del trastorno, en un grado medible o detectable, aunque impiden o inhiben una progresión o un empeoramiento del trastorno o condición, o un síntoma, es un resultado satisfactorio. Por lo tanto, en el caso de una afección o trastorno tratable expresando un ácido nucleico terapéutico en tejido blanco, la cantidad de ARN terapéutico o proteína terapéutica producida para mejorar una afección tratable mediante un método de la invención dependerá de la afección y el resultado deseado y puede ser fácilmente averiguado por un experto en la técnica. Las cantidades apropiadas dependerán de la afección tratada, el efecto terapéutico deseado, así como del sujeto individual (por ejemplo, la biodisponibilidad dentro del sujeto, género, edad, etc.). La cantidad efectiva puede determinarse midiendo los efectos fisiológicos relevantes.

Las aplicaciones veterinarias también se contemplan en la presente invención. Por consiguiente, en una realización, la invención proporciona métodos de tratamiento de mamíferos no humanos, que implican la administración de una nanopartícula basada en quitosano de la invención a un mamífero no humano que necesita tratamiento.

Administración Oral

Los compuestos de la invención se pueden administrar por vía oral. La administración oral puede implicar la deglución, de modo que el compuesto ingrese al tracto gastrointestinal. Las composiciones de la invención también se pueden administrar directamente en el tracto gastrointestinal.

Las formulaciones adecuadas para administración oral incluyen formulaciones sólidas tales como tabletas, cápsulas que contienen partículas, líquidos o polvos, pastillas (incluidas las llenas de líquido), masticables, multipartículas y nanopartículas, geles, películas, óvulos y aerosoles.

5 Las formulaciones líquidas incluyen suspensiones, soluciones, jarabes y elixires. Las formulaciones líquidas se pueden preparar mediante la reconstitución de un sólido.

10 Las formas de dosificación de tableta generalmente contienen un desintegrante. Los ejemplos de desintegrantes incluyen almidón glicolato sódico, carboximetil celulosa sódica, carboximetil celulosa cálcica, croscarmelosa sódica, crospovidona, polivinilpirrolidona, metil celulosa, celulosa microcristalina, hidroxipropil celulosa sustituida con alquilo inferior, almidón, almidón pregelatinizado y alginato de sodio. Generalmente, el disgregante comprenderá de 1% en peso a 25% en peso, preferiblemente de 5% en peso a 20% en peso de la forma de dosificación.

15 Los aglutinantes generalmente se usan para impartir cualidades cohesivas a una formulación de tableta. Los aglutinantes adecuados incluyen celulosa microcristalina, gelatina, azúcares, polietilenglicol, gomas naturales y sintéticas, polivinilpirrolidona, almidón pregelatinizado, hidroxipropil celulosa e hidroxipropil metilcelulosa. Las tabletas también pueden contener diluyentes, tales como lactosa (monohidratada, monohidrato secada por pulverización, anhidra y similares), manitol, xilitol, dextrosa, sacarosa, sorbitol, celulosa microcristalina, almidón y fosfato de calcio dibásico dihidratado.

20 Las tabletas también pueden comprender opcionalmente agentes tensioactivos, tales como laurilsulfato de sodio y polisorbato 80, y deslizantes tales como dióxido de silicio y talco. Cuando están presentes, los agentes tensioactivos pueden comprender de 0.2% en peso a 5% en peso de la tableta, y los deslizantes pueden comprender de 0.2% en peso a 1% en peso de la tableta.

25 Las tabletas también contienen generalmente lubricantes tales como estearato de magnesio, estearato de calcio, estearato de zinc, estearilfumarato de sodio y mezclas de estearato de magnesio con lauril sulfato de sodio. Los lubricantes generalmente comprenden de 0.25% en peso a 10% en peso, preferiblemente de 0.5% en peso a 3% en peso de la tableta.

30 Otros ingredientes posibles incluyen antioxidantes, colorantes, agentes saborizantes, conservantes y agentes de enmascaramiento del sabor.

35 Las mezclas de tabletas se pueden comprimir directamente o con un rodillo para formar tabletas. Las mezclas de tabletas o porciones de mezclas pueden alternativamente ser granuladas en húmedo, en seco o fundidas, solidificadas fundidas o extruirse antes de la formación de tabletas. La formulación final puede comprender una o más capas y puede estar recubierta o sin revestir; incluso puede estar encapsulado.

40 La formulación de tabletas se discute en Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, vol. 1, por H. Lieberman y L. Lachman (Marcel Dekker, Nueva York, 1980).

45 Las películas orales consumibles para uso humano o veterinario son típicamente formas de dosificación de película delgada hinchables, solubles en agua o hinchables en agua que pueden disolverse rápidamente o mucoadhesivas y típicamente comprenden un polímero formador de película, un aglutinante, un solvente, un humectante, un plastificante, un estabilizador o emulsionante, un agente modificador de la viscosidad y un disolvente. Algunos componentes de la formulación pueden realizar más de una función.

También se incluyen en la divulgación perlas multiparticuladas que comprenden una composición de la invención.

50 Otros ingredientes posibles incluyen antioxidantes, colorantes, saborizantes y potenciadores del sabor, conservantes, agentes estimulantes salivales, agentes refrigerantes, codisolventes (incluidos aceites), emolientes, agentes de carga, agentes antiespumantes, agentes tensioactivos y agentes de enmascaramiento del sabor.

55 Las películas de acuerdo con la invención se preparan típicamente por secado por evaporación de películas acuosas delgadas recubiertas sobre un soporte o papel de soporte pelable. Esto se puede hacer en un horno o túnel de secado, típicamente un secador revestidor combinado, o mediante liofilización o aspiración.

60 Las formulaciones sólidas para administración oral se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

Se conocen otras tecnologías de liberación adecuadas tales como dispersiones de alta energía y partículas osmóticas y recubiertas.

65 Administración Parenteral

5 Los compuestos de la invención también pueden administrarse directamente en la corriente sanguínea, en el músculo o en un órgano interno. Los medios adecuados para administración parenteral incluyen intravenosa, intraarterial, intraperitoneal, intratecal, intraventricular, intrauretral, intraesternal, intracraneal, intramuscular y subcutánea. Los dispositivos adecuados para administración parenteral incluyen inyectores de aguja (incluyendo microagujas), inyectores sin aguja y técnicas de infusión.

10 Las formulaciones parenterales son típicamente soluciones acuosas que pueden contener excipientes tales como sales, carbohidratos y agentes tamponadores, pero, para algunas aplicaciones, pueden formularse más adecuadamente como una solución no acuosa estéril o como una forma seca para usarse junto con un vehículo adecuado tal como agua estéril, libre de pirógenos.

La preparación de formulaciones parenterales en condiciones estériles, por ejemplo, mediante liofilización, puede realizarse fácilmente usando técnicas farmacéuticas convencionales bien conocidas por los expertos en la técnica.

15 La solubilidad de los compuestos usados en la preparación de soluciones parenterales puede aumentarse mediante el uso de técnicas de formulación apropiadas, tales como la incorporación de agentes potenciadores de la solubilidad.

20 Las formulaciones para administración parenteral se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada. De este modo, los compuestos de la invención se pueden formular como un líquido sólido, semisólido o tixotrópico para la administración como un depósito implantado que proporciona una liberación modificada del compuesto activo.

25 Administración Tópica

30 Los compuestos de la invención también se pueden administrar tópicamente a la piel o a la mucosa, es decir, por vía dérmica o transdérmica. Las formulaciones típicas para este propósito incluyen geles, hidrogeles, lociones, soluciones, cremas, ungüentos, polvos para espolvorear, apósitos, espumas, películas, parches cutáneos, obleas, implantes, esponjas, fibras, vendajes y microemulsiones.

Otros medios de administración tópica incluyen administración por electroporación, iontoforesis, fonoforesis, sonoforesis y microagujas o sin aguja (por ejemplo, inyección de Powderject™, Bioject™, etc.).

35 Las formulaciones para administración tópica se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

40 Administración Inhalada/Intranasal

45 Los compuestos de la invención también pueden administrarse por vía intranasal o por inhalación, típicamente en forma de un polvo seco (solo, como una mezcla, por ejemplo, en una mezcla seca con lactosa, o como una partícula de componente mixto) de un producto seco inhalador de polvo o aerosol en aerosol desde un recipiente presurizado, bomba, pulverizador, atomizador o nebulizador, con o sin el uso de un propulsor adecuado.

Las cápsulas, ampollas y cartuchos para usar en un inhalador o insuflador pueden formularse para contener una mezcla en polvo del compuesto de la invención, una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón y un modificador del rendimiento tal como l-leucina, manitol o estearato de magnesio

50 Las formulaciones para administración inhalada/intranasal se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

55 Administración Rectal/Intravaginal

Los compuestos de la invención se pueden administrar por vía rectal o vaginal, por ejemplo, en forma de un supositorio, pesario o enema. La manteca de cacao es una base de supositorio tradicional, pero se pueden usar varias alternativas según corresponda.

60 Las formulaciones para la administración rectal/vaginal se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida y programada.

65 Administración Ocular/Auditiva

Los compuestos de la invención también se pueden administrar directamente al ojo u oído, típicamente en forma de gotas. Otras formulaciones adecuadas para la administración ocular y auditiva incluyen ungüentos, implantes biodegradables (por ejemplo, esponjas de gel absorbibles, colágeno) y no biodegradables (por ejemplo, silicona), obleas, lentes y sistemas de partículas. Las formulaciones también pueden administrarse por iontoforesis.

5 Las formulaciones para administración ocular/aural se pueden formular para que sean de liberación inmediata y/o modificada. Las formulaciones de liberación modificada incluyen liberación retardada, sostenida, pulsada, controlada, dirigida o programada.

10 EXPERIMENTAL

Ejemplo 1: Preparación poliplex de hasta 250 µg/ml seguido de concentración hasta >1 mg/ml.

15 Ver figura 1 y descripción a continuación para descripciones a modo de ejemplo de reactivos, concentraciones y proporciones.

Se probó un simple aparato de mezclado en línea a pequeña escala utilizando bombas de jeringa y bombas peristálticas de alta velocidad, tubos de silicona y uniones en T de polipropileno. Este proceso se usó para hacer poliplex con una concentración final de ADN de hasta 250 µg/mL con una proporción N/P de 20 utilizando 23mero/98% de DDA quitosano (es decir, polímeros de quitosano con un promedio de 23 monómeros (glucosamina), y 98% de desacetilación). Los resultados mostraron que el tamaño de partícula y el PDI de los poliplex podían controlarse estrechamente controlando las concentraciones de materia prima, las proporciones de mezcla volumétrica y las velocidades de flujo de las soluciones de ADN y quitosano. Además, se encontró que la incorporación de sacarosa en las materias primas de ADN y quitosano ayudaba al proceso de fabricación al reducir el tamaño de partícula y PDI. La inclusión de sacarosa también evitó la agregación de partículas durante el proceso de concentración. Los poliplex congelados con una concentración de ADN de aproximadamente 1 mg/mL y que contienen hasta un 15% de sacarosa fueron estables durante al menos 1 mes. Además, el proceso de mezcla en línea se ajustó fácilmente desde 50 mL hasta 2 L con valores bajos de desviación estándar relativa (RSD): tamaño de partícula = ±9%, PDI = ±6%.

30

Material	Proveedor	Catálogo #
Quitosano (23 mer, 98% DDA)	Biosyntech	N/A
pADN (pCHS4-3xFLAG-CMV-SEAP-attB)	enGene Inc.	N/A
pADN (pCMV-INT)	enGene Inc.	N/A
pADN (gWIZ-SEAP)	Aldevron LLC	5005
pADN (gWIZ-Luciferasa)	Aldevron LLC	5001
Sacarosa, grado ACS	Fisher Scientific	S5-3
Tubo de silicona curado con Pt, 1/16 "ID	Cole-Parmer	95802-02
Conexiones en T PP, ID de 3/32 "	Cole-Parmer	30623-57
Jeringas PP, 3 mL	B-D	309585
Jeringas PP, 10 mL	B-D	309604
Jeringas PP, 20 mL	B-D	309661
Jeringas PP, 30 mL	B-D	309650
Conexiones Luer PP, ID de 1/8"	Cole-Parmer	45500-04
Filtros de jeringa de 25 mm, membrana Supor de 0.2 µm	Pall	4612
Filtros de jeringa de 32 µm de membrana de Supor 0.2 µm	Pall	4652
Cubetas desechables, PS, semi-micro de 1.5 ml	Plastibrand	759075D

ES 2 660 846 T3

Células Zeta capilares dobladas	Malvern Instruments	DTS 1060
Cartucho TFF, 73 cm ² , 1 mm ID, 100K MWCO	GE Healthcare	56-4101-14
Material	Proveedor	Catálogo #
Cartucho TFF, 850 cm ² , 1 mm ID, 100K MWCO	GE Healthcare	56-4102-15
Cartucho TFF, 73 cm ² , 1 mm ID, 500K MWCO	GE Healthcare	56-4101-18
Kit de ensayo PicoGreen Quant-iT ds DNA HS	Invitrogen	Q32854
enzima EcoR1, 20,000 U/mL	New England BioLabs	R0101S
Tampón EcoR1, 10X	New England BioLabs	B0101S
Enzima quitosanasasa, 62 U/mL	Sigma	C0794
Escalera de ADN superentorchada	Invitrogen	15622-012
tampón de carga Cian/Amarillo, 6X	Invitrogen	10482-035
Bromuro de Etidio	EM Science	4410
Agarosa, Ultra-Pura	Invitrogen	15510-027
Línea xcelular 293T-K	Dr. Kieffer at UBC	N/A
Medio Eagle modificado por Dulbecco	VWR	X16777-128
Suero Bovino fetal	Wisent	080150
Penicilina/Estreptomina	Invitrogen	15140-122
Solución salina amortiguada por fosfato	Invitrogen	21600-010
Tripsina	Invitrogen	25300-062
Opti-mem	Invitrogen	31985-070
Ensayo quimioluminescente SEAP	Roche	1779842
Enzima de fosfatasa alcalina de la placenta	Sigma	P-3895
Sero albúmina bovina (BSA)	Sigma	A9418
Glicerol	Sigma	G5516
Placa de 96 pozos de fondo plano blanca Microlite-1	VWR	7417

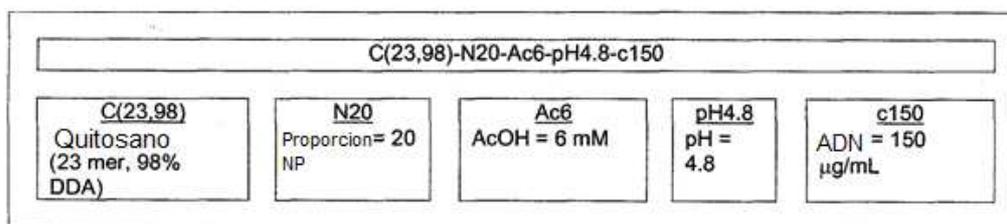
Equipo	Fabricante
Bomba de jeringa, NE-1000	New Era Pump Systems Inc.
Bomba de jeringa, NE-1000	New Era Pump Systems Inc.
Bombas peristálticas, Bomba Materflex L/S activada con cabezales de bomba L/S Easy-Load II	Cole Parmer
Medidor de tamaño de partícula Zetasizer Nano (ZEN 3600)	Malvern Instruments
pH Metro, Accumet AB15	Fisher Scientific
Espectrofotometro UV, Ultrospec 2100 pro	Biochrom Ltd.
Fluorómetro Qubit, cat # Q32857	Invitrogen

Sistemas de imágenes FluorChem que incluye el software AlphaEaseFC v3.1	Alpha Inotech Corp
Luminómetro (LmaxII384) que incluye el Pro software Softmax v4.7.1	Molecular Devices
Sistema TFF de pequeña escala (MidGee)	GE Healthcare
Sistema TFF de escala media (QuixStand)	GE-Healthcare

Convención de Nomenclatura de Políplex

Los términos se refieren al tipo de quitosano, proporción N/P, contenido de ácido acético, pH y concentración de ADN. Un ejemplo con una descripción detallada se da en la Tabla 1.

Tabla 1: Ejemplo de convención de nomenclatura de formulación de políplex



10 Flujo de Proceso de Mezcla en Línea

En la Figura 1 se muestra un bloque de proceso típico para la fabricación de un lote de 1 L seguido de concentración de TFF.

15 Mezcla en línea a Pequeña Escala

Se ensayó un simple aparato de mezclado en línea a pequeña escala usando bombas de jeringa, tubos de silicona de 1/16 de pulgada ID; y una unión de polipropileno de ID de 3/32 pulgadas en una configuración en T. En la Figura 2 se muestra un esquema de la configuración con jeringas de 3 mL de capacidad. Tenga en cuenta que el volumen máximo de la jeringa para esta configuración es de 60 mL. Este proceso se usó para hacer políplex con una concentración final de ADN de 150 µg/mL con una proporción de NP de 20 usando 24mer/98% de DDA quitosano. Las materias primas de ADN y quitosano se mezclaron a una proporción en volumen de 2:1 para producir formulaciones de políplex uniformes.

25 Mezcla en Línea a Mediana Escala

Se ensayó un simple aparato de mezcla en línea de escala media usando bombas peristálticas, tubos de silicona de 3/16 pulgadas de ID; y una unión de polipropileno de ID de 3/16 de pulgada. En la Figura 3 se muestra un esquema de la configuración con una unión Y. Tenga en cuenta que el volumen máximo de salida para esta configuración está limitado solo por el volumen de los vasos de materia prima. Este proceso se usó para hacer políplex con una concentración final de ADN de 150 µg/mL con una proporción de NP de 20 usando 24mer/98% de DDA quitosano. Las materias primas de ADN y quitosano se mezclaron a una proporción en volumen de 2:1 para producir formulaciones de políplex uniformes.

35 Proceso TFF

Antes de llevar a cabo los estudios de TFF, los filtros de fibra hueca se enjuagaron y limpiaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Para llevar a cabo la concentración, el sistema TFF se configuró como se muestra en el diagrama esquemático (Figura 4) y se purgó de agua residual. Después de cerrar la válvula de permeado y abrir completamente la válvula de contrapresión, se agregó políplex de ADN-quitosano al depósito del producto. La concentración se inició al encender la bomba, abrir completamente la válvula de permeado y luego ajustar la válvula de contrapresión a la presión de entrada del filtro objetivo. Durante el proceso de concentración, la masa del permeado recolectado se controló en un equilibrio y se usó para determinar cuándo se había alcanzado la concentración de ADN objetivo. Vea la ecuación a continuación:

$$[ADN]_{\text{Retenido}} = [ADN]_{\text{inicial}} \times \text{Masa}_{\text{inicial}} \div (\text{Masa}_{\text{inicial}} - \text{Masa}_{\text{permeado}})$$

Después de alcanzar la reducción del volumen objetivo, se detuvo el proceso de concentración cerrando la válvula de permeado y abriendo completamente la válvula de contrapresión. Después de purgar las líneas de fluido retenido y recoger el producto final, se sometió una muestra de este producto pos-TFF para la prueba analítica y la

concentración de ADN mediante el ensayo picogreen. El resto se almacenó a 4°C hasta que se completaron las pruebas analíticas, y luego se utilizó o se congeló para su almacenamiento.

Prueba Analítica

5

Tamaño de Partícula

Las medidas del tamaño de partícula se realizaron usando un instrumento de dispersión de luz Zetasizer Nano. En general, las muestras no se diluyeron o se diluyeron 20 veces en NaCl 10 mM (0.4 mL mínimo) y se cargaron en una cubeta desechable. El Zetasizer se programó para incubar la muestra durante 3 minutos a 25°C antes de las mediciones triplicadas de 3 minutos. El diámetro promedio Z y la polidispersidad (PDI) se informaron con una desviación estándar (n=3). El Zetasizer también se programó para tener en cuenta la composición de las muestras con respecto a la viscosidad y el índice de refracción.

15 Potencial de Zeta

Las mediciones del potencial Zeta se realizaron usando un instrumento de dispersión de luz Zetasizer Nano. En general, las muestras no diluidas fueron cargadas en una celda capilar doblada Zetasizer (0.8 mL mínimo). El Zetasizer se programó para incubar la muestra durante 3 minutos a 25°C antes de repetir las mediciones (el software Zetasizer determinó automáticamente el número de repeticiones). Los valores del potencial Zeta se informaron con la desviación estándar (n=3). El Zetasizer también se programó para tener en cuenta la composición final de las muestras con respecto a la viscosidad y la constante dieléctrica.

25 Estabilidad a Corto Plazo por Congelación

Para estudios de estabilidad a corto plazo, el producto de poliplex final se congeló y almacenó a la temperatura apropiada (-20°C, -30°C o -80°C). En algunos casos, las muestras se congelaron rápidamente en baños de hielo seco/etanol, luego se almacenaron a las temperaturas apropiadas. En los momentos apropiados, las muestras se descongelaron a temperatura ambiente y se analizaron como se describe.

30

Cuantificación de ADN con PicoGreen

Antes de la medición de ADN usando el ensayo PicoGreen, el ADN debe ser liberado del poliplex mediante el quitosano. Después de la liberación, el ADN se somete a digestión de ADN con una enzima de restricción adecuada para linealizar los plásmidos de ADN superenrollados.

35

Digestión de Quitosanasa

Para asegurar la liberación completa del ADN, el poliplex se diluyó primero en 50 µl en 150 mM de NaOAc, pH 5.5 a 37 °C con el fin de alcanzar una concentración de 0.909-1.818 mM de quitosano. (Para partículas C (24,98)-N20-c1000, las muestras típicamente se diluyen 1/70 y 1/35 para alcanzar la concentración objetivo de quitosano) 50 µl del poliplex diluido se digirieron con 50 µl de 4.44 U/mL de quitosanasa durante 2 h 37°C. (La concentración de quitosanasa en almacenamiento es de 62 U/mL y se diluyó con NaOAc 50 Mm frío, pH 5.5 a 37°C).

45 Digestión EcoR1

Después de la incubación, *χ µL de la muestra digerida de quitosanasa se agregó a 5 µL de EcoR1 y 5 µL de tampón EcoR1 y se llevaron a un volumen final de 50 µL con agua MilliQ. (El volumen de muestra χ µL se ajustó para que la concentración final de ADN fuera de 4 ng/µL). Típicamente para la muestra de partículas C(24,98) -N20-c1000, el volumen de muestra χ es 25 µL). La muestra de EcoR1 se incubó luego durante 30 minutos a 37°C.

50

Ensayo PicoGreen

El kit de ensayo PicoGreen Quant-iT ds DNA HS se suministró con dos tampones (A y B) y dos patrones (1 y 2). El tampón A se diluyó 1:20 en el tampón B para preparar la solución "A/B". Los patrones 1 y 2 se diluyeron 20 veces con la solución A/B (10 µl en 200 µl). Las concentraciones finales para los estándares 1 y 2 fueron 0 y 10 ng/µL, respectivamente.

55

10 a 20 µL de muestra digerida con EcoR1 se llevó a un volumen final de 200 µL con solución A/B, se agitó brevemente en vórtice, se incubó a TA durante 2 minutos y luego se midió la fluorescencia en el Fluorómetro Qubit de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

60

Electroforesis de Gel

Para la verificación de la captura de ADN en el poliplex, las muestras se sometieron a electroforesis en gel. Se combinaron alícuotas de muestras de 1-5 µL (objetivo de 800 ng de ADN) con 2 µL de tampón de carga TrackIt y se

65

llevaron a un volumen final de 10 μ L con agua. Los carriles estándar se cargaron con la escalera de ADN Superentorchada. Las muestras se resolvieron en un gel de agarosa al 0.8% que contenía bromuro de etidio (50 μ g/ml) a 120 V durante 45 minutos. El gel fue fotografiado con el FluorChem Imaging System.

5 Transfección in vitro

En general, la transfección in vitro de células 293T-K con formulaciones de poliplex se realizó en dos etapas: preparación de células seguida de transfección.

10 Mantenimiento de células 293T-K

La línea celular 293T-K fue cortesía del laboratorio del Dr. Kieffer en UBC y se preparó de la siguiente manera. Las células de riñón humano se transformaron con el antígeno T de SV40; crecido en medio de Eagle modificado con Dulbecco de alta glucosa (DMEM) que contiene 10% de suero bovino fetal (FBS) y penicilina/estreptomicina; y mantenido por debajo del 80% de confluencia.

15

Preparación de Células para la Transfección

20 Las células se prepararon para la transfección de la siguiente manera. El día antes de la transfección, se añadieron células 293T-K a placas de cultivo tisular de 6 pozos (3×10^5 células/pozo) en 3 mL de medio completo (glucosa elevada DMEM + 10% FBS + pen/strep). El día de la transfección, se determinó el recuento celular para dos pozos seleccionados lavando las células 1X con células tripsinizantes con solución salina tamponada con fosfato (PBS) con 1 ml de tripsina al 0.05%, añadiendo 1 ml de medio completo y contando 10 μ l usando un hemocitómetro. Si las células fueron confluentes al ~50% ($\sim 7 \times 10^5$ células/pozo), entonces se realizó la transfección. (Si las células estaban demasiado dispersas o demasiado confluentes, entonces la transfección no avanzaba).

25

Transfección de Células

30 La transfección se llevó a cabo de la siguiente manera. Primero, se retiró el medio de cada pozo seguido por la adición de 1 mL de Opti-mem (ajustado a pH 5.0 con HCl y se filtró con filtro de 0.2 μ m) a cada pozo, se arremolinó suavemente y luego se retiró. (Se lavaron seis pozos a la vez para evitar que las células se desprendieran). Luego, se agregó cuidadosamente otro 1 mL de Opti-mem (pH 5.0) a cada pozo para no desalojar las células. A continuación, se añadieron muestras de poliplex a cada pozo (objetivo de 2 μ g de ADN), se arremolinaron y se incubaron a 37°C durante 2 h. Después de la incubación, el medio se retiró y se reemplazó con 2 mL de medio completo y se incubó de nuevo a 37°C. En los puntos de tiempo requeridos, el sobrenadante se eliminó y almacenó a -20°C para el posterior ensayo SEAP.

35

Ensayo SEAP

40 El ensayo SEAP se realizó usando el kit de ensayo de quimioluminiscencia SEAP. Todos los reactivos para el ensayo se equilibraron a 25°C durante 30 minutos antes de su uso. Los estándares para el ensayo se prepararon disolviendo fosfatasa alcalina placentaria a 1 mg/mL en tampón de dilución 1X del kit enriquecido con albúmina de suero bovino al 0.1% y glicerol al 50% y luego diluyendo en diluciones en serie 10 veces con DMEM a 0.01 pg/ μ L. Los estándares y las muestras descongeladas se diluyeron 1 en 4 con tampón de dilución, se inactivaron con calor a 45 65°C durante 30 min, se incubaron en hielo durante 2 min, se centrifugaron (16100 x rcf durante 2 min a temperatura ambiente) y los sobrenadantes se transfirieron a tubos nuevos. Después de equilibrar a 25°C durante 5 min, se añadieron 50 μ l de las muestras y patrones a cada pozo de una placa de Microlite-1 por duplicado. Después, se añadió tampón de inactivación (50 μ L) a cada pozo y se pipetearon hacia arriba y hacia abajo suavemente para mezclar, sin crear burbujas y se incubaron durante 5 min. El sustrato/reactivo potenciador se preparó durante la 50 incubación de 5 minutos en una proporción de 1:19 de sustrato a potenciador. El sustrato/potenciador se añadió entonces a cada pozo, se incubó durante 20 min y luego se leyó la placa en el luminómetro con un tiempo de integración de 1 segundo.

Resultados

55 Mezcla en Línea de Velocidad Rápida de C(23,98) -N40-c75 + TFF

El poliplex se preparó usando el sistema de mezclado en línea de escala media a tasas de flujo variables de 90, 210, 270 y 420 mL/min. Este sistema de mezcla también utilizó un dispositivo de mezcla estática en línea para evaluar la 60 utilidad del dispositivo. Este sistema tampoco contiene ningún excipiente. En este estudio, la concentración de ADN inicial del poliplex fue de 0.075 mg/mL y luego se concentró por TFF a 0.25 mg/mL.

Las tasas de flujo se seleccionaron en base al número de Reynolds calculado para el dispositivo de mezcla estática en línea (Tabla 2), que determina el número mínimo de elementos que se requieren para lograr una mezcla óptima de una solución a una tasa de flujo dada. La siguiente ecuación se basa en las instrucciones del fabricante.

65

$$Re = \frac{3157 \cdot Q \cdot S}{\mu \cdot D}$$

Re = número de Reynolds, Q = tasa de flujo (galones por minuto),

5 S = gravedad específica, μ = viscosidad, D = diámetro del tubo interior

Tabla 2: número de Reynolds calculado para el dispositivo de mezclado estático en línea

Tasa de Flujo (mL/min)	Número de Reynold's	Número de Reynold's Óptimo
90	311.1	500 a 1000
210	694.6	
270	933.2	
420	1451.6	

10 La Tabla 3 muestra que aumentar la tasa de flujo final de la mezcla da como resultado un aumento en el tamaño de partícula promedio en Z y PDI. La concentración por TFF no mostró un efecto significativo sobre el tamaño de partícula, PDI, potencial zeta, viscosidad (Tabla 3) o transfección in vitro (Figura 5).

15 Tabla 3: Tamaño, PDI y potencial de Zeta de poliplex de mediana escala mezclados a diferentes tasas

Tasa de Flujo (mL/min)		Diámetro (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Viscosidad (cp)
90	posmezcla	84.7 ± 1.2	0.163 ± 0.013	32.4 ± 0.9	1.03
"	final	86.5 ± 0.6	0.161 ± 0.004	33 ± 1	1.06
210	posmezcla	87.1 ± 0.7	0.170 ± 0.003	36 ± 2	n.d.
"	final	91.4 ± 0.7	0.178 ± 0.011	n.d.	n.d.
270	posmezcla	91.5 ± 0.7	0.199 ± 0.010	37 ± 1	n.d.
"	final	95.9 ± 1.6	0.189 ± 0.015	36.9 ± 0.5	1.07
420	posmezcla	98.2 ± 0.4	0.214 ± 0.005	38 ± 2	1.03
"	final	99.9 ± 1.0	0.214 ± 0.009	36.2 ± 0.5	1.07

Mezcla en Línea y Precipitación TFF

20 Con el fin de lograr una concentración de ADN de al menos 1 mg/mL, se intentó mezclar poliplex a 0.15 mg/mL de ADN, luego TFF a 1 mg/mL. Sin embargo, durante estos estudios, se observó precipitación significativa después del paso de concentración (datos no mostrados). Esto ocurrió a una mezcla a pequeña escala (3 mL/min y 23 mL/min) y a procesos de mezcla a media escala (210 mL/min y 420 mL/min).

Inclusión de Sacarosa Durante la Formación de poliplex para Evitar la Precipitación

25 Con el fin de remediar el problema de precipitación durante TFF, incluimos todos los excipientes (~10% en peso de sacarosa, 0.09% en peso de metil parabeno, 0.01% en peso de propil parabenos) tanto en el quitosano como en materias primas de ADN antes de mezclar para formar el poliplex. El dispositivo de mezcla estático no se usó. Se encontró que la inclusión de los excipientes evitaba la agregación de partículas y la precipitación durante el proceso de concentración de TFF. Además, se encontró que el PDI y la estabilidad de la partícula se mejoraron cuando no se incluyó un dispositivo de mezcla estática.

Lote de Pequeña Escala con Proceso Actualizado

35 Se realizó un lote a pequeña escala usando 10% de sacarosa en las materias primas de ADN y quitosano antes de la mezcla, y la concentración de TFF usando una velocidad de recirculación de 90 mL/min (velocidad de

cizallamiento de 7200 s⁻¹). Después de TFF, el tamaño de partícula era <200 nm sin precipitación. El tamaño de partícula se resume en la Tabla 4.

Tabla 4

5

Veces de incremento del TFF	Diámetro (nm)	PDI	[ADN]
mezcla (pre-TFF)	100 ± 0.8	0.134	0.16
1.5x	102 ± 1	0.150	0.23
3x	107 ± 0.6	0.146	0.40
7.5x	117 ± 2	0.160	1.01

10

Después de 18 h a TA, el tamaño se estabilizó a aproximadamente 140 nm y no se observó precipitación después de tres días a TA (Figura 6). Además, la muestra posterior a TFF no tenía precipitación después de la congelación/descongelación a -20°C u -80°C. Después de 24 horas a TA, las partículas descongeladas se habían estabilizado a aproximadamente 160 y 150 nm para -20°C y -80°C, respectivamente (Tabla 5). Además, un ensayo de transfección in vitro mostró que el lote tenía eficacia biológica (datos no mostrados).

Tabla 5: Mezcla a pequeña escala con 10% de sacarosa y TFF rápido: Congelación-Descongelación

	Condición de congelación-descongelación			
	-20°C F/T	-20°C F/T +24 hrs @ RT	-80°C F/T	-80°C F/T + 24 hrs @ RT
Diámetro (nm)	141±2	160±2	132±1	150±2
PDI	0.184	0.174	0.168	0.169

15

Lote a Media Escala con Proceso Actualizado

20

Se realizó un lote confirmatorio a media escala utilizando todos los cambios del proceso descritos anteriormente: filtrado de almacenamiento de ADN antes de mezclarlo con la solución de sacarosa; incluyendo 10% de sacarosa en el ADN y las materias primas de quitosano antes de la mezcla, y la concentración de TFF usando una tasa de recirculación de 90 ml/min (tasa de cizallamiento de 7200 s⁻¹). Además, se realizó un lote de control que excluía los excipientes de sacarosa y parabeno.

25

En el lote sin excipiente (control), el precipitado se observó fácilmente durante y después de TFF (datos no mostrados). Sin embargo, en el lote de excipientes (Tabla 6), no se observó precipitado hasta que la concentración de ADN excedió aproximadamente 1.5 mg/mL.

Tabla 6: Parámetros del Lote de poliplex Incluyendo Excipientes

Veces de incremento del TFF	Diámetro (nm)	PDI	Diámetro (nm) +24hr	PDI +24hr	[ADN]
mezcla (pre-TFF)			96 ± 0.5	0.201	0.14
2x	101 ± 0.5	0.207	106 ± 0.6	0.194	0.29
3.3x			125 ± 0.6	0.188	0.50
5x			147 ± 1	0.205	0.72
6x	139 ± 0.6	0.193	187 ± 2	0.210	0.90
8x	154 ± 0.6	0.208	232 ± 2	0.238	0.92
10x	ppt				

30

Lote de Demostración de Media Escala de 0.8L

Probamos la escalabilidad del proceso de mezcla en línea y TFF hasta un tamaño de lote de 0.8 L. El poliplex se mezcló a un volumen de 0.8 L, y luego se concentró a 1.1 mg/mL por TFF. Este estudio incluyó una prueba de la homogeneidad del proceso de mezcla al tomar múltiples alícuotas de 5 mL de poliplex mezclado al comienzo, en el medio y al final del proceso de mezcla. El proceso TFF utilizó un cartucho de 850 cm² (mientras que los estudios anteriores de TFF a pequeña escala usaron un cartucho de 73 cm²) e incorporaron una prueba de tiempos de espera del producto concentrado a 4°C antes de vializar y congelar a -30°C.

Prueba de Homogeneidad del Proceso de Mezcla en Línea

Múltiples muestras de 0.5 mL fueron recolectadas en el primer, medio y final 25 mL del proceso de mezclado para determinar la homogeneidad durante el proceso de mezclado. Los resultados indicaron que las primeras muestras de mezclado comenzaron a aproximadamente 120 nm, luego se estabilizaron a 80 nm después de 15 mL de mezclado.

TABLA 7. Homogeneidad de la mezcla en línea de mediana escala

Muestra	Concentración de DNA (mg/mL)	Diámetro promedio Z- (nm)	PDI
Mezcla B1	0.154	118 ± 2	0.283
Mezcla B3	N/A	95 ± 2	0.270
Mezcla B4	N/A	81 ± 2	0.186
Mezcla B5	0.153	80 ± 0.7	0.189
Mezcla M1	0.137	79 ± 1	0.177
Mezcla E1	0.139	83 ± 1	0.181
Mezcla E3	0.136	82 ± 1	0.183

Todas las muestras se congelaron previamente a -30°C, se descongelaron y luego se analizaron. "B" indica muestras de 5 mL desde el comienzo del proceso de mezclado (primeros 25 mL) en orden de 1 a 5. "M" indica muestras de 5 mL de la mitad del proceso de mezclado (comenzando a alrededor de 400 mL) en orden de 1 a 5. "E" indica muestras de 5 mL desde el final del proceso de mezclado (comenzando a alrededor de 750 mL) en orden de 1 a 5.

Prueba de Tiempos de Espera para el Producto Final TFF

Después de que se completó el proceso TFF, el producto TFF final se dispensó en alícuotas de 9 x 10 mL (en viales de vidrio ámbar de 20 mL) y se selló. Los viales se sometieron a varios tiempos de retención para imitar las condiciones típicas de mantenimiento de fabricación:

(a) 3 viales	Almacenado inmediatamente @ -30C
(b) 3 viales	Almacenado @ 4C x 4 h, luego almacenado @ - 30C
(c) 3 viales	Almacenado @ 4C x 24 h, luego almacenado @ - 30C

Los resultados de los productos descongelados indicaron una buena estabilidad del producto durante un tiempo de mantenimiento de 24 horas a 4°C (Tabla 8). Además, la estabilidad posdescongelación durante 7 horas para la muestra "4h @ 4°C, luego -30°C" también mostró estabilidad de partículas con un aumento de menos del 10% en comparación con el material de partida.

Tabla 8

Muestra	Concentración de DNA (mg/mL)	Diámetro promedio Z- (nm)	PDI
0 h @ 4°C, luego -30°C	N/A	110 ± 0.7	0.211
4h @ 4°C, luego -30°C	1.139	112 ± 0.2	0.217

ES 2 660 846 T3

24h @ 4°C, luego -30°C	N/A	114 ± 1	0.214
4h @ 4°C, luego -30°C, luego 7hrs@RT	N/A	122 ± 0.2	0.198

Todas las muestras se congelaron previamente a -30°C, se descongelaron y luego se analizaron.

Corrida de Ingeniería 2L a Mediana Escala

5 Probamos la escalabilidad del proceso de mezcla en línea y TFF a un tamaño de lote de 2 L. El poliplex se mezcló a un volumen de 2 L y luego se concentró a 1.1 mg/mL mediante TFF. Este estudio incluyó una prueba de repetición de la homogeneidad del proceso de mezcla tomando alícuotas múltiples de 5 ml de poliplex mixto al comienzo (descarte de 25 ml), en el medio y al final del proceso de mezcla. El proceso TFF usó un cartucho de 850 cm² e incorporó una retención durante la noche del producto concentrado final a 4 °C antes de vializar y congelar a -30 °C.

En general, las propiedades físicas de los poliplex estuvieron dentro de los rangos y límites esperados (Tabla 9).

Tabla 9

Muestra	Diám. Prom. Z. (nm)	PDI	Potencial Zeta (mV)	Conductividad (mS/cm)
Pre-TFF (fresco)	83 ± 0.5	0.167	N/A	N/A
Pos-TFF (fresco)	118 ± 0.6	0.207	+38 ± 3	0.525 ± 0.007
Pos-TFF (descongelado)	137 ± 0.5	0.217	+34 ± 2	0.527 ± 0.008

Todas las muestras fueron frescas o congeladas previamente a -30°C (como se indica), descongeladas y luego analizadas.

20 Escalabilidad de la Mezcla en Línea con Excipientes

25 El siguiente es un resumen de las propiedades físicas de los lotes de poliplex realizados por mezcla en línea en dos escalas diferentes y cuatro volúmenes de lotes (Tabla 10). Todos los lotes fueron C (24,98) -N20-c150-pH4.8-Suc15% -Pbn 0.1%. Las proporciones de mezcla fueron 2:1 ADN:quitosano. Los flujos totales para la mezcla a pequeña y mediana escala fueron de 23.3 mL/min y 210 mL/min, respectivamente. (A estas velocidades, las tasas de flujo lineal a través de la tubería para las dos escalas de mezcla eran equivalentes)

Tabla10. Propiedades físicas de los lotes de mezcla a escala

Tamaño del Lote (L)	Escala de Mezcla	Diam. Prom. Z (nm)	PDI
0.05	Pequeña	95 ± 1	0.161
0.2	Med-	95 ± 1	0.183
0.8	Med-	80 ± 1	0.179
2.0	Med-	83 ± 1	0.167
% de desviación estándar relativa		9%	6%

30 Prueba de Captura de ADN Mediante Electroforesis en Gel

Varias formulaciones de poliplex se probaron para la presencia de ADN libre para determinar si todo el ADN fue capturado por quitosano. En general, no se observó ADN libre en ninguna formulación probada (no se muestra).

35 Transfección In-Vitro poliplex

40 La transfección in-vitro se llevó a cabo en dos formulaciones para comparar poliplex fabricado por el método de goteo (por ejemplo, el documento U.S.N. 11/694,852) frente a la mezcla en línea. La eficacia media de transfección del método de mezcla en línea fue aproximadamente 11% mayor que el método de goteo.

ES 2 660 846 T3

Método de mezcla	Eficiencia promedio de la transfección (ng SEAP/mL)
Goteo	2810 ± 16
Mezcla en línea	3112 ± 150

Las formulaciones de poliplex finales fueron C(23,98) -N40-Ac10.5-pH 4.8-c75. Para el lote de mezcla en línea, la proporción de mezcla de volumen de ADN: quitosano fue de 2:1 y la tasa de flujo de salida fue de 3 mL/min.

- 5 Las diferentes relaciones de volumen de la materia prima alteran el tamaño de poliplex y PDI

Las composiciones se prepararon de acuerdo con la tabla 11 usando los métodos descritos en este documento.

Tabla 11

Proporción en volumen	Concentración de la solución de trabajo de AND (µg/mL)	Concentración de la solución de trabajo de quitosano (µg/mL)
1:5	450	1800
1:2	225	2250
1:1	150	3000
2:1	112.5	4500
5:1	90	9000
Concentraciones objetivo finales de µg/mL ADN y 150 µg/mL quitosano		

- 10 El tamaño de partícula y PDI de las preparaciones se analizaron como se describe en este documento. Los resultados se muestran en la Figura 7 y establecen que el tamaño de partícula se puede controlar alterando los volúmenes de materia prima mientras se mantiene sustancialmente la proporción de mezcla de quitosano y ADN, y
- 15 manteniendo sustancialmente las concentraciones de mezcla de quitosano y ADN.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición que comprende poliplex de quitosano-ácido nucleico hidratados y estables y un inhibidor de agregación, en el que dicha composición tiene una concentración de ácido nucleico mayor que o igual a 0.5 mg/ml, y dicha composición está libre de precipitado de poliplex, y además dicho inhibidor de agregación es un azúcar
- 10 2. La composición según la reivindicación 1, que comprende:
una concentración de ácido nucleico mayor que 0.75 mg/ml, o
una concentración de ácido nucleico mayor que 1.0 mg/ml, o
15 una concentración de ácido nucleico mayor que 1.2 mg/ml, o
una concentración de ácido nucleico mayor que 1.5 mg/ml.
- 20 3. La composición según la reivindicación 1, en la que dicho inhibidor de agregación se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, glicerol, fructosa y glucosa.
- 25 4. La composición según la reivindicación 1, que comprende una concentración de contra anión inferior a aproximadamente 80 mM.
- 30 5. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichos poliplex comprenden moléculas de quitosano que tienen un peso molecular medio inferior a 500 kDa.
- 35 6. La composición de acuerdo con la reivindicación 1, en la que dichos poliplex tienen una proporción N:P mayor que o igual a 2:1.
- 40 7. La composición según la reivindicación 1, en la que dicha composición es isotónica.
- 45 8. Un método para concentrar poliplex de ácido nucleico de quitosano, que comprende proporcionar una dispersión no concentrada poliplex de quitosano-ácido nucleico y un inhibidor de agregación, concentrar dicha dispersión no concentrada poliplex de quitosano-ácido nucleico usando filtración de flujo tangencial para formar una dispersión concentrada poliplex de quitosano-ácido nucleico estable, donde dicha dispersión concentrada tiene una
50 concentración de ácido nucleico mayor que o igual a 0.5 mg/ml y está libre de precipitado policristalino, y en el que dicha etapa concentradora mantiene dicha concentración original de dicho inhibidor de agregación en dicha dispersión concentrada; en el que el inhibidor de la agregación es un azúcar.
- 55 9. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que dicho inhibidor de agregación se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, glicerol, fructosa y glucosa.
- 60 10. El método de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el mezclado en línea se usa para preparar dicha dispersión no concentrada poliplex de quitosano- ácido nucleico.
- 65 11. Una dispersión concentrada poliplex de quitosano-ácido nucleico producible por el método de acuerdo con la reivindicación 8.
12. Una composición farmacéutica que comprende poliplex de quitosano-ácido nucleico hidratados y estables y un inhibidor de la agregación, donde dicha composición tiene una concentración de ácido nucleico mayor que o igual a 0.5 mg/ml, donde dichos poliplex de quitosano-ácido nucleico comprenden una construcción de ácido nucleico terapéutico, en el que dicha composición está libre de precipitado de poliplex, y en el que dicho inhibidor de agregación es un azúcar.
13. Un método para alterar el diámetro poliplex de quitosano-ácido nucleico formados en una dispersión de mezcla que comprende un inhibidor de agregación en donde el inhibidor de agregación es un azúcar, y adicionalmente en donde dicha dispersión de mezcla se puede producir mezclándose en línea una solución de quitosano y una solución de ácido nucleico, en la que las tasas de flujo de dicha solución de quitosano y dicha solución de ácido nucleico se ajustan para mantener la velocidad de flujo de la mezcla y para mantener las concentraciones de mezcla de quitosano y ácido nucleico, y el método que comprende alterar el volumen de dispersión de mezcla de quitosano y ácido nucleico sin alterar sustancialmente la proporción de mezcla de quitosano a ácido nucleico y sin alterar la concentración de quitosano o ácido nucleico en la dispersión de mezcla.
14. La composición de la reivindicación 1, en la que dichos poliplex tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 500 nm.

15. Las composiciones de la reivindicación 1, en donde dichos poliplex tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 250 nm.
- 5 16. La composición de la reivindicación 1, en la que dichos poliplex tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 200 nm.
17. La composición de la reivindicación 1, en la que dichos poliplex tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 150 nm.
- 10 18. La composición de la reivindicación 1, en la que dichos poliplex tienen un índice de polidispersidad promedio de menos de aproximadamente 0.4.
19. La composición de la reivindicación 1, en la que los poliplex tienen un índice de polidispersidad promedio de menos de aproximadamente 0.3.
- 15 20. La composición de la reivindicación 1, en la que los poliplex tienen un índice de polidispersidad promedio de menos de aproximadamente 0.2.
- 20 21. La composición de la reivindicación 1, en la que los poliplex tienen un diámetro promedio inferior a aproximadamente 750 nm.
22. La composición de la reivindicación 1, en la que los poliplex aumentan en diámetro promedio en menos del 50% a temperatura ambiente durante 24 horas.
- 25 23. La composición de la reivindicación 1, en la que dichos poliplex comprenden moléculas de quitosano que tienen menos de 3000 unidades monoméricas de glucosamina.

Figura 1: Bloque de proceso para un lote de mezcla en línea de 1 L y concentración

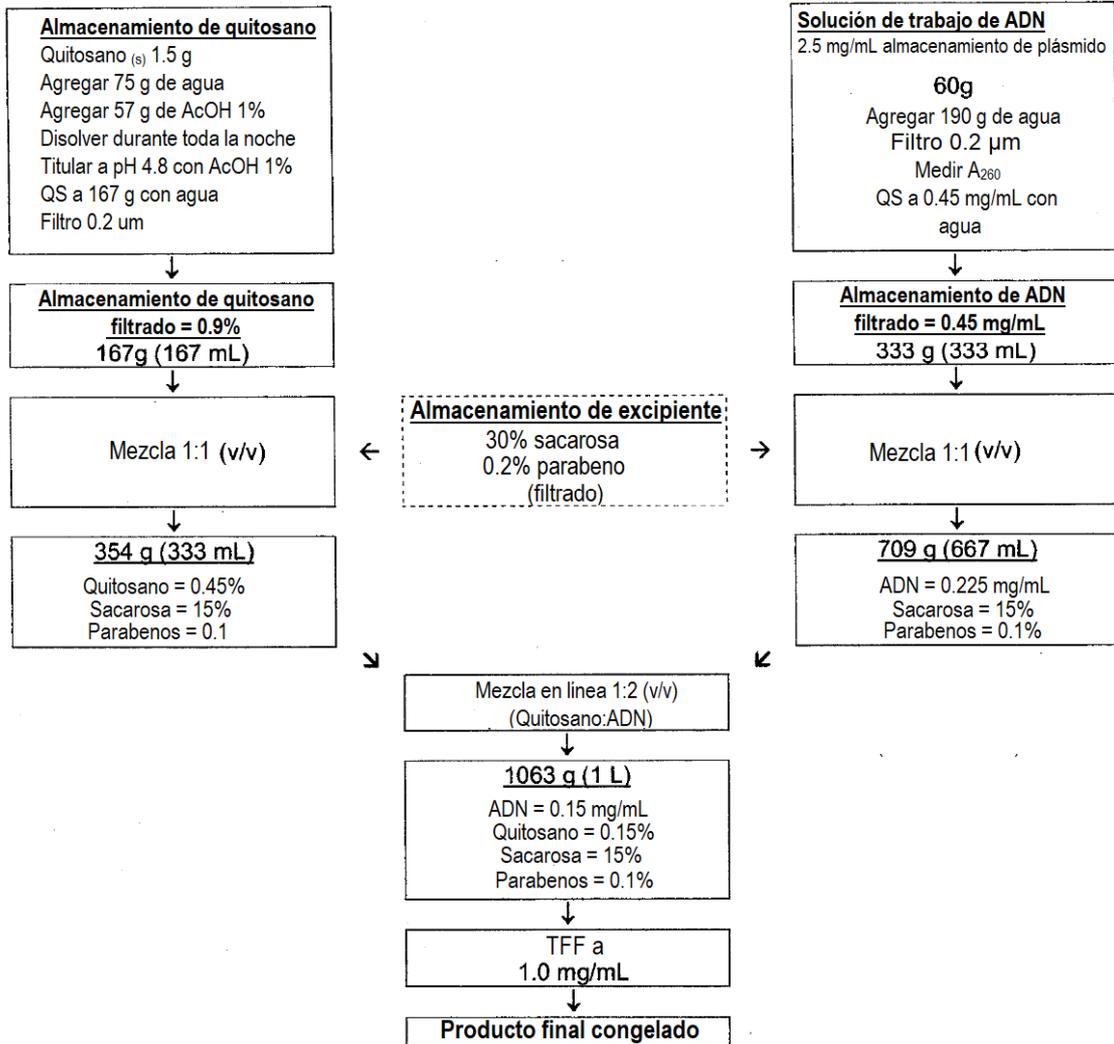


Figura 2: mezcla en línea a escala pequeña

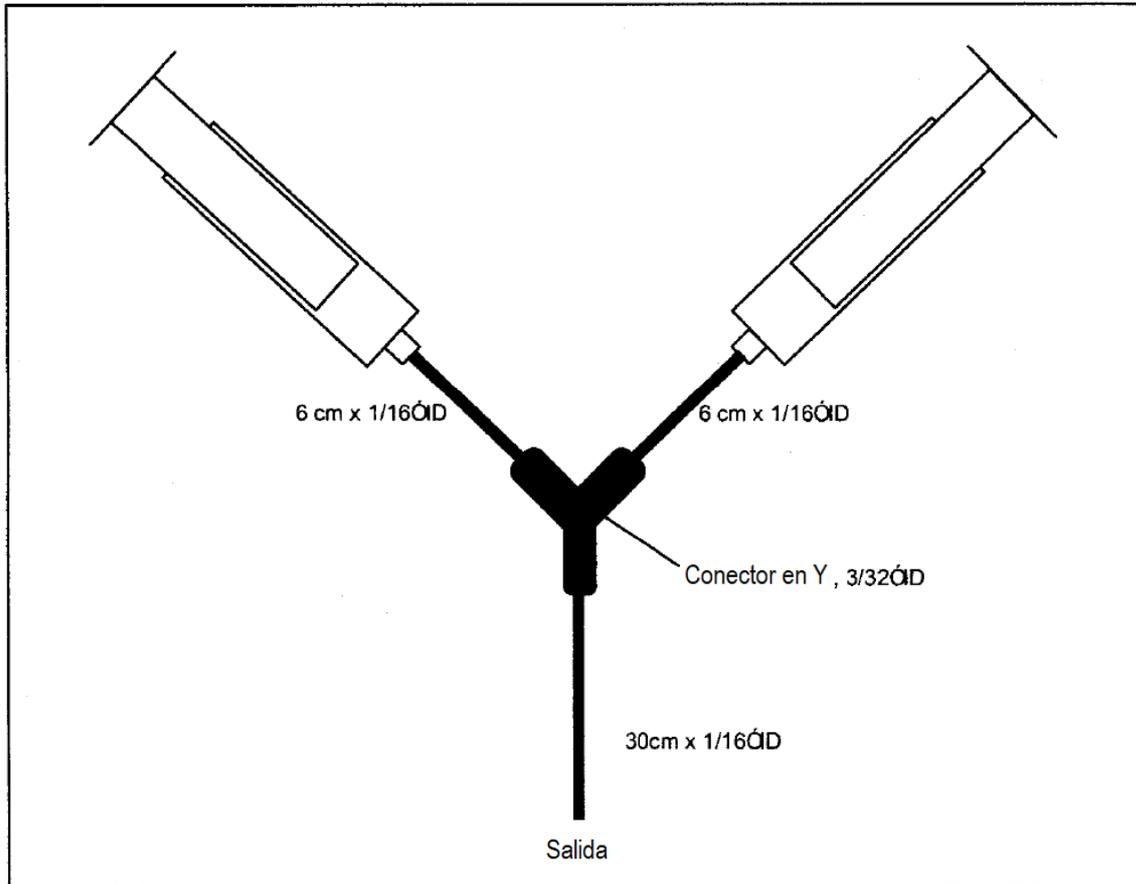


Figura 3: Esquema de mezcla en línea a escala mediana para 10 L

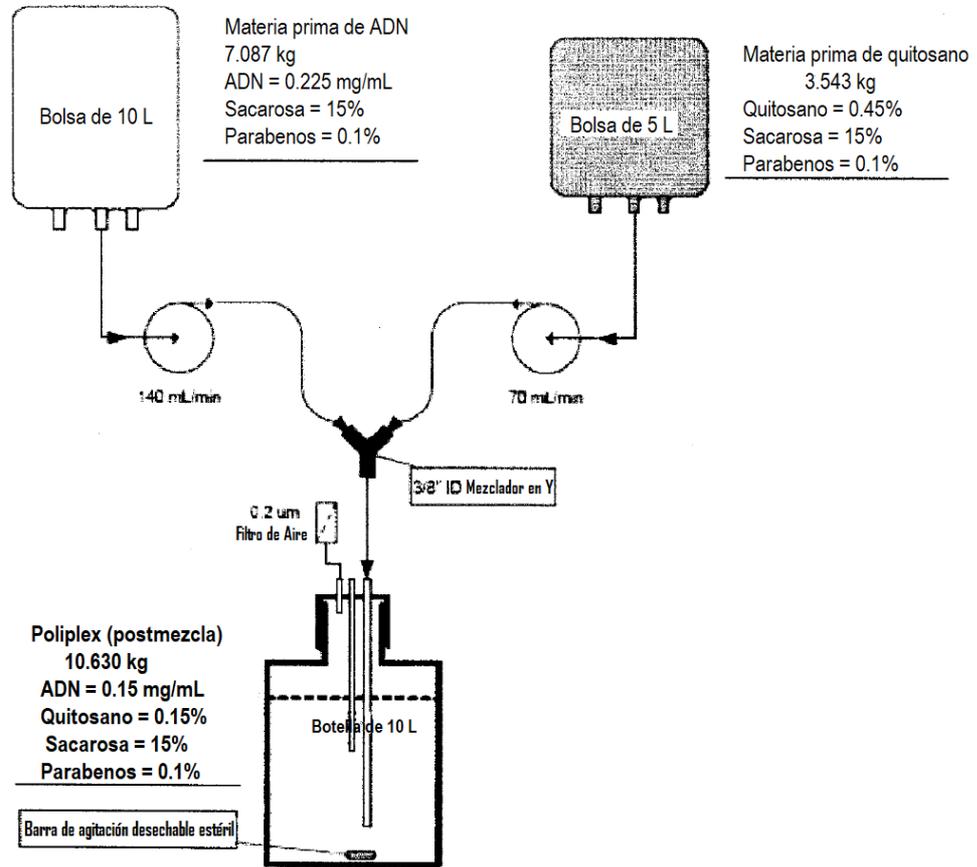


Figura 4: Concentración TFF

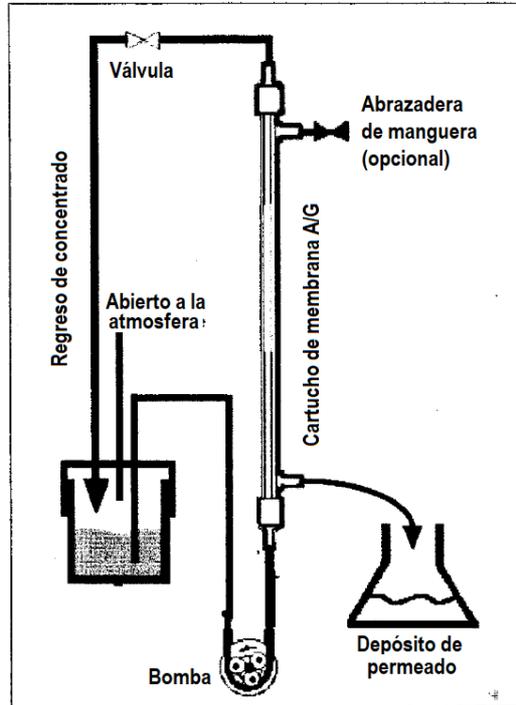


Figura 5: Transfección In vitro de Poliplex de escala mediana mezclado en diferentes proporciones

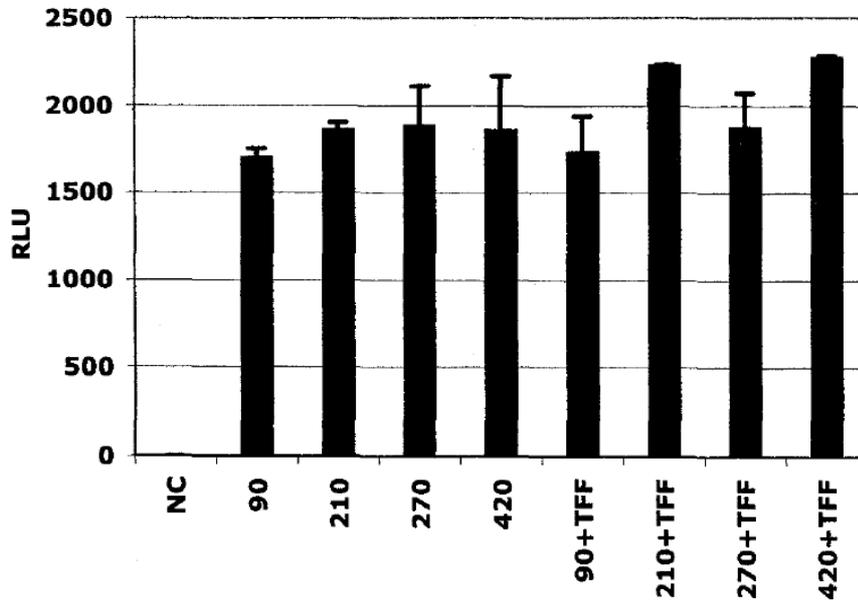


Figura 7:

