

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 617 921**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

**A61K 47/20** (2006.01)

**A61K 47/26** (2006.01)

**A61K 47/34** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **31.03.2011 PCT/GB2011/000493**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.10.2011 WO11121301**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.03.2011 E 11714594 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.12.2016 EP 2552478**

54 Título: **Excipientes para estabilizar partículas virales**

30 Prioridad:

**19.10.2010 GB 201017648**

**31.03.2010 GB 201005517**

**31.03.2010 GB 201005521**

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

**20.06.2017**

73 Titular/es:

**STABILITECH LTD. (100.0%)**

**Unit 6, Sovereign Business Park, Albert Drive**

**Burgess Hill, West Sussex RH15 9TY, GB**

72 Inventor/es:

**DREW, JEFFREY;**

**WOODWARD, DAVID;**

**BRAINBRIDGE, JOHN y**

**CORTEYN, AMANDA**

74 Agente/Representante:

**PONS ARIÑO, Ángel**

**Observaciones:**

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

ES 2 617 921 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

Excipientes para estabilizar partículas virales

5 **Campo de la invención**

La presente invención se refiere a formulaciones de virus estables durante el almacenamiento.

10 **Antecedentes de la invención**

10 Algunas moléculas biológicas son tan suficientemente estables que pueden aislarse, purificarse y después almacenarse en solución a temperatura ambiente. Sin embargo, esto no es posible para muchos materiales y se han probado técnicas que implican el almacenamiento a baja temperatura, adición de estabilizadores, liofilización, formación de vacío y secado al aire para garantizar la auto-preservación. A pesar de la disponibilidad de estas técnicas, algunos materiales biológicos todavía muestran niveles insatisfactorios de estabilidad durante el almacenamiento y algunas técnicas conducen a coste e inconvenientes añadidos. Por ejemplo, el transporte y almacenamiento refrigerados es caro. Además, el transporte refrigerado no está frecuentemente disponible para el transporte de medicinas tales como vacunas en vías de desarrollo.

20 En particular, los estreses del secado por congelación o liofilización pueden ser muy dañinos para algunos materiales biológicos. La liofilización de productos biofarmacéuticos implica congelar soluciones o suspensiones de biomateriales termosensibles, seguido de secado primario y secundario. La técnica se basa en la sublimación del agua a temperatura bajo cero a vacío sin la fusión de la solución. La liofilización representa una etapa clave para la fabricación de proteína sólida y productos farmacéuticos para vacunas. La velocidad de difusión del vapor de agua del biomaterial congelado es muy baja y, por tanto, el procedimiento requiere tiempo. Adicionalmente, tanto las etapas de congelación como de secado introducen estreses que son capaces de desplegar o desnaturalizar proteínas.

30 Las proteínas son moléculas con estructuras primaria, secundaria, terciaria y, en algunos casos, cuaternaria, definidas. La estructura desempeña una función importante en dar a una proteína su función biológica específica. Desafortunadamente, la complejidad estructural de los productos farmacéuticos biológicos tales como las proteínas los hace susceptibles a diversos procedimientos que producen inestabilidad estructural y funcional. Deben protegerse la integridad conformacional y los grupos funcionales de la degradación.

35 La inestabilidad puede ser una consecuencia de una variedad de reacciones covalentes y no covalentes o modificaciones en solución. La degradación se clasifica generalmente en dos categorías principales: en primer lugar degradación física o degradación de vía no covalente y en segundo lugar la vía de degradación covalente.

40 Las proteínas pueden degradarse mediante procedimientos físicos tales como adsorción interfacial y agregación que puede reducir significativamente una potencia y estabilidad del fármaco de proteína. Una segunda consecuencia es que el despliegue mediado por la adsorción en una interfase puede ser frecuentemente una etapa de inicio para la agregación irreversible de la proteína en solución. La exposición del núcleo de proteína en una superficie hidrófoba puede producir la adsorción como consecuencia de estreses inducidos por agitación, temperatura o pH; todos los cuales pueden conducir a agregación.

45 Las proteínas pueden someterse a modificación química tal como oxidación, isomerización, hidrólisis, reordenamiento de disulfuros, eliminación beta, desamidación y formación de aductos. Los principales mecanismos hidrolíticos de degradación incluyen hidrólisis de enlaces peptídicos, desamidación de asparagina y glutamina, y la isomerización de ácido aspártico. Una característica común de la vía de degradación hidrolítica es que una variable de formulación significativa, con respecto a las velocidades de las reacciones, es el pH.

50 Como la estabilidad de la proteína puede afectar significativamente la seguridad y eficacia de un agente terapéutico, la composición de componentes en una formulación biofarmacéutica puede afectar el grado de degradación de las proteínas. El método de formulación de un producto biofarmacéutico también puede afectar la facilidad y frecuencia de administración.

55 Debido a problemas relacionados con la inestabilidad y la agregación, la mayoría de las actuales formulaciones estables de proteínas no son formulaciones líquidas. Normalmente, las proteínas se secan por congelación (liofilizan) para proporcionar formulaciones estables de proteínas. En las formulaciones frecuentemente hay un agente de carga. Las formulaciones secadas por congelación se distribuyen y se conservan en forma seca, normalmente como un polvo, en un vial sellado, ampolla o jeringa. Por ejemplo, el documento WO 97/04801 describe formulaciones liofilizadas estables de anticuerpos anti-IgE que tienen que reconstituirse inmediatamente antes de uso.

65 El documento WO-A-2006/0850082 informa de un producto desecado o preservado que comprende un azúcar, un material cargado tal como una proteína de histona y un componente biológico de desecación o termosensible. El

azúcar forma una matriz amorfa sólida. Sin embargo, la histona puede tener consecuencias inmunológicas si el componente biológico preservado se administra a un ser humano o animal.

5 El documento WO 2008/114021 describe un método de preservación de partículas virales. El método comprende secar una solución acuosa de uno o más azúcares, una polietilenimina y las partículas virales para formar una matriz amorfa sólida que comprende las partículas virales. La solución acuosa contiene la polietilenimina a una concentración de 15  $\mu$ M o menos basada en la masa molar promedio en número ( $M_n$ ) de la polietilenimina y la concentración de azúcar o, si está presente más de un azúcar, la concentración de azúcar total es mayor de 0,1 M.

10 El documento WO 2010/035001 describe un método de preservación de un polipéptido en el que se seca una solución acuosa del polipéptido, por ejemplo se seca por congelación, en presencia de uno o más azúcares y una polietilenimina (PEI). La composición secada resultante normalmente se proporciona como un polvo seco estable en un vial sellado, ampolla o jeringa. Una solución se reconstituye del polvo con el fin de administrar el polipéptido a un paciente, por ejemplo, mediante inyección.

15 El secado, y especialmente la liofilización, son, sin embargo, procedimientos costosos y que requieren tiempo. Sería ventajoso si su uso pudiera evitarse. Los materiales biológicamente activos frecuentemente sufren una pérdida de actividad tras el calentamiento y secado. Adicionalmente, la necesidad de reconstituir un polvo secado por congelación en un disolvente antes del uso del polipéptido es un inconveniente. De hecho, puede conllevar riesgos para el paciente o profesional médico que realiza la etapa de reconstitución si el procedimiento no se lleva a cabo correctamente.

20 Así, es ventajoso para proporcionar formulaciones líquidas de virus y proteína que no requieren reconstitución con el fin de ser usado. Por consiguiente, hay una demanda de formulaciones de virus y proteína inyectables líquidas estables. Hay una demanda de formulaciones de anticuerpo inyectables líquidas estables altamente concentradas.

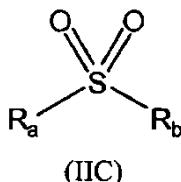
### Sumario de la invención

30 Ahora se ha encontrado sorprendentemente que las soluciones acuosas listas para uso estables durante el almacenamiento de partículas virales pueden proporcionarse por el uso de ciertos excipientes y opcionalmente uno, dos o más azúcares. Estas formulaciones retienen la estabilidad a largo plazo. Pueden prepararse sin una etapa de secado o de liofilización. Evitan la necesidad de reconstituir una solución de un polvo secado por congelación antes de uso. También se ha encontrado que estos excipientes y opcionalmente uno, dos o más azúcares pueden preservar partículas virales durante la fabricación. Además, se ha encontrado que estos excipientes y opcionalmente uno, dos o más azúcares pueden preservar muestras tomadas de un ser humano o animal.

40 La presente invención proporciona un procedimiento para la preparación de una solución acuosa estable durante el almacenamiento lista para uso que se proporciona en un envase sellado y que contiene partículas virales vivas, procedimiento que comprende:

(a) proporcionar una solución que comprende:

- agua o solución salina fisiológica, que está opcionalmente tamponada con un tampón fisiológicamente aceptable;
- 45 - partículas virales vivas de *Adenoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Poxviridae*, *Flaviviridae* o *Herpesviridae*;
- un excipiente que es una N,N-di(alquilo  $C_{1-6}$ )-glicina o N,N,N-tri(alquilo  $C_{1-6}$ )-glicina, o una sal o un éster fisiológicamente aceptable de las mismas;
- opcionalmente uno o más azúcares; y
- 50 - opcionalmente un compuesto de sulfona de fórmula (IIC):



55 en la que  $R_a$  y  $R_b$  representan independientemente alquilo  $C_{1-6}$ ; y

(b) sellar la solución en un recipiente.

60 En un aspecto del procedimiento de la invención, las partículas virales son de un adenovirus, virus de la variolovacuna, virus de la gripe o virus del sarampión.

En otro aspecto del procedimiento de la invención, el excipiente es N,N-dimetilglicina o N,N,N-trimetilglicina, o una sal o un éster fisiológicamente aceptable de las mismas.

5 En un aspecto adicional del procedimiento de la invención, el excipiente es N,N-dimetilglicina o una sal o un éster fisiológicamente aceptable de la misma.

En un aspecto adicional del procedimiento de la invención, el uno o más azúcares comprenden sacarosa o manitol.

10 En un aspecto adicional del procedimiento de la invención el uno o más azúcares comprenden sacarosa y rafinosa.

En un aspecto adicional del procedimiento de la invención, el compuesto de sulfona de fórmula (IIC) es metilsulfonilmetano.

15 En un aspecto adicional del procedimiento de la invención, la solución comprende además:

- (a) un adyuvante;
- (b) un agente de ajuste de la tonicidad; y/o
- (c) un conservante.

20 En un aspecto adicional del procedimiento de la invención, la solución es isotónica.

En un aspecto adicional del procedimiento de la invención, la solución se proporciona en un envase sellado bajo nitrógeno.

25 En un aspecto adicional del procedimiento de la invención, el recipiente sellado es un vial sellado, ampolla, jeringa, cartucho, bolsa flexible o botella de vidrio.

En un aspecto adicional del procedimiento de la invención, la solución se pasa a través de un filtro de esterilización en la etapa (a).

30 La presente invención también proporciona una solución acuosa estable durante el almacenamiento lista para uso que contiene partículas virales vivas que se proporciona en un envase sellado, siendo dicha solución acuosa obtenible por un procedimiento de la invención.

### 35 **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1a muestra el efecto de las formulaciones de prueba sobre la actividad recuperada de formulaciones de adenovirus mantenidas a 4 °C durante una semana. Barras grises y blancas representan formulaciones de prueba. Las figuras en el eje x se refieren a la concentración en M. Las barras negras representan muestras de control. "Inicial" = título de virus de entrada para el almacenamiento, "PBS" = formulación que no contiene excipiente adicional, "Azúcares" = formulación que comprende sacarosa 1 M, rafinosa 100 mM. Barras de error = estándar de la media, n = 3.

40 La Figura 1b muestra el efecto de las formulaciones de prueba sobre la actividad recuperada de formulaciones de adenovirus que contienen azúcares (sacarosa 1 M, rafinosa 100 mM) mantenidas a 4 °C durante una semana. Barras grises y blancas representan formulaciones de prueba. Las figuras en el eje x se refieren a concentraciones en M. Las barras negras representan muestras de control, "Inicial" = título de virus de entrada antes del almacenamiento, "PBS" - formulación que no contiene excipientes adicionales, "Azúcares" = formulación que comprende sacarosa 1 M, rafinosa 100 mM. Barras de error = error estándar de la media, n = 3.

45 La Figura 1c muestra el efecto de las formulaciones de prueba sobre la actividad recuperada de formulaciones de adenovirus que no contienen azúcares mantenidas a 37 °C durante una semana. Barras grises y blancas representan formulaciones de prueba. Las figuras en el eje x se refieren a concentración en M. Las barras negras representan muestras de control, "Inicial" = título de virus de entrada antes del almacenamiento, "PBS" = formulación que no contiene excipientes adicionales, "Azúcares" = formulación que comprende sacarosa 1 M, rafinosa 100 mM, Barras de error = error estándar de la media, n = 3.

50 La Figura 1d muestra el efecto de las formulaciones de prueba sobre la actividad recuperada de formulaciones de adenovirus que contienen azúcares (sacarosa 1 M, rafinosa 100 mM), mantenidas a 37 °C durante una semana. Barras grises y blancas representan formulaciones de prueba. Las figuras en el eje x se refieren a la concentración en M. Las barras negras representan muestras de control, "Inicial" = título de virus de entrada antes del almacenamiento, "PBS" = formulación que no contiene excipientes adicionales, "Azúcares" = formulación que comprende sacarosa 1 M, rafinosa 100 mM, Barras de error = error estándar de la media, n = 3.

La Figura 2 muestra los resultados obtenidos en el Ejemplo 2 en el que se evaluó que la capacidad de once formulaciones para estabilizar adenovirus contra la exposición térmica tras 7 días a 37 °C.

55 La Figura 3 muestra los resultados obtenidos en el Ejemplo 3 en el que se evaluó la capacidad de once formulaciones para estabilizar MVA contra la exposición térmica a 37 °C durante 7 días.

La Figura 4 muestra una representación del espacio de diseño en el Ejemplo 4. Los círculos numerados representan formulaciones dentro del espacio de diseño que se prueba. Este diseño es un diseño de RSM de CCF. Los números en círculos se refieren a I.D. de muestra en la Tabla 3.

La Figura 5 resume la estadística del modelo usado para representar los datos en el Ejemplo 4.

La Figura 6 muestra términos retenidos en el modelo después del ajuste en el Ejemplo 4. Las barras de error que no cruzan el origen indican un factor significativo al 95 % de IC.

La Figura 7 es una representación de respuesta de superficie del título viral recuperado predicho en las formulaciones de TMG y manitol en el Ejemplo 4.

La Figura 8 es una captura de pantalla de los parámetros y salidas de las predicciones óptimas basadas en el modelo de los datos en el Ejemplo 4, generadas usando simulaciones de Monte-Carlo. La formulación marcada (línea 4) es el óptimo identificado.

La Figura 9 muestra una representación 3D del espacio de diseño en el Ejemplo 5. Esferas representan formulaciones dentro del espacio de diseño que se prueba. Este diseño es un diseño de RSM de Doehlert.

La Figura 10 resume la estadística del modelo usado para representar los datos en el Ejemplo 5.

La Figura 11 muestra términos retenidos en el modelo en el Ejemplo 5 después del ajuste. Barras de error que no cruzan el origen indican un factor significativo al 95 % de IC.

La Figura 12 es un gráfico de respuesta de superficie del título viral predicho usando el modelo del Ejemplo 5 en formulaciones de DMG y sacarosa a tres niveles diferentes de rafinosa, concretamente: "Baja" = rafinosa a 0 mM, "Media" = rafinosa a 150 mM, "Alta" = rafinosa a 300 mM.

La Figura 13 muestra una captura de pantalla de los parámetros y salidas de las predicciones óptimas basadas en el modelo de los datos en el Ejemplo 5, generadas usando simulaciones de Monte-Carlo. La óptima predicha marcada es la concentración de sacarosa de 0,5 M, concentración de DMG 0,4 M y concentración de rafinosa de 272,5 mM.

La Figura 14 muestra un gráfico de región óptima usando el modelo derivado del Ejemplo 5. La Figura 14A es una gráfica de contornos donde una cruz marca el óptimo predicho. La coloración indica el nivel de variable. La Figura 14B es un gráfico que marca la región de modelo donde la actividad viral recuperada predicha es mayor o igual a la salida.

La Figura 15 muestra la actividad viral recuperada de diversas formulaciones después de 6 meses de almacenamiento a +4 °C en el Ejemplo 6.

La Figura 16 muestra la actividad viral recuperada para la 'mejor' formulación en el Ejemplo 6 que comprende sacarosa 1 M, rafinosa 100 mM y DMG 0,7 M en cada momento de tiempo y exposición térmica.

La Figura 17 muestra la reducción en la actividad viral recuperada con el tiempo a exposición térmica de +37 °C en diversas formulaciones en el Ejemplo 6.

La Figura 18 muestra una representación del espacio de diseño en el Ejemplo 7. Los círculos numerados representan formulaciones dentro del espacio de diseño que se probaron. Este diseño es un diseño de RSM de CCF.

La Figura 19 resume la estadística del modelo usado para representar los datos en el Ejemplo 7.

La Figura 20 muestra términos retenidos en el modelo en el Ejemplo 7 después del ajuste. Las barras de error que no cruzan el origen indican un factor significativo al 95 % de IC.

La Figura 21 muestra un gráfico de contornos del título viral recuperado predicho en formulaciones de DMG y manitol en el Ejemplo 7.

### **Descripción detallada de la invención**

#### **Sumario**

Se proporcionan soluciones acuosas estables de partículas virales según la invención. Las soluciones son líquidos farmacéuticamente aceptables estériles que pueden administrarse a un paciente sin tener que reconstituirse de, por ejemplo, un polvo seco inmediatamente antes de uso.

En una realización, la presente invención se refiere a la preservación de partículas virales por un derivado de glicina N-alquilado o una sal o un éster del mismo, y un compuesto de sulfona de fórmula (IIC). El derivado de glicina N-alquilado y el compuesto de sulfona pueden interactuar sinérgicamente para estabilizar las partículas virales en un entorno líquido.

Las soluciones pueden tomar la forma de volúmenes parenterales pequeños de 100 ml o menos o volúmenes parenterales grandes de 100 ml o más. Las soluciones son líquidos farmacéuticamente aceptables estériles que pueden administrarse a un paciente sin tener que reconstituirse de, por ejemplo, un polvo seco inmediatamente antes de uso.

Las soluciones son capaces de presentar estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo. Pueden, por tanto, almacenarse durante 6 a 18 meses o más en un frigorífico, es decir, a temperaturas de 2 a 8 °C. En algunos casos, las soluciones pueden almacenarse a temperatura ambiente durante tales periodos de tiempo. Las soluciones así poseen suficiente estabilidad para permitir que sean fabricadas en una fábrica, distribuidas, por ejemplo, a mayoristas farmacéuticos y farmacias, y guardadas antes de uso sin que se produzca un nivel de degradación inaceptable.

Normalmente, las soluciones se proporcionan como líquidos claros. Las soluciones son normalmente incoloras. Adicionalmente, pueden comprender un tampón fisiológicamente aceptable y/o un agente de ajuste de la tonicidad y/o un conservante. Las soluciones pueden así ser isotónicas. Las soluciones se tapan en un recipiente apropiado en un vial, ampolla, jeringa, cartucho, bolsa flexible o botella de vidrio. Así se fabrican en forma lista para uso en una fábrica. Por tanto, no han sido reconstituidas de una composición sólida tal como un liofilizado inmediatamente antes de uso.

Los excipientes de la invención pueden preservar además partículas de virus durante la fabricación de soluciones de dichas partículas de virus.

### Partículas virales

Las partículas virales usadas en la presente invención están vivas y pueden ser virus completos. Un virus vivo es capaz de infectar y replicarse dentro de la célula huésped. Las partículas pueden ser partículas similares a virus (VLP) o nucleocápsides. El virus puede ser infeccioso para células procariontas o eucariotas. El virus puede ser un virus humano o de animal.

La partícula viral puede ser, o puede derivarse de, un virus de ADNbc, un virus de ADNmc, un virus de ARNbc, un virus de ARNmc(+), un virus de ARNmc(-), un virus de ARNmc-RT o un virus de ADNbc-RT. La partícula viral es, o puede derivarse de, un virus de las siguientes familias:

1. *Adenoviridae* tales como los adenovirus A, B, C, D, E o F humanos que incluyen los serotipos Ad5, Ad2, Ad4, Ad6, Ad24, Ad35, Ad36 humanos;
2. *Flaviviridae* tales como el virus de la fiebre amarilla, virus del Nilo occidental, virus del dengue, virus de la hepatitis C;
3. *Orthomyxoviridae* tales como los virus de la gripe A, B, C que incluyen, pero no se limitan a, serotipos del virus de la gripe A H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9H2, H7N2, H7N3 y N10N7;
4. *Paramyxoviridae* tales como el virus paragripal 1 humano, virus del sarampión y virus de las paperas;
5. *Parvoviridae* tales como virus adeno-asociado;
6. *Picornaviridae* tales como virus de la poliomielitis humana, virus de la enfermedad de pies y boca (incluyendo los serotipos O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1);
7. *Poxviridae* tales como el virus de la variolovacuna, virus de la viruela y poxvirus aviar (viruela aviar);
- y
8. *Herpesviridae* tales como el virus del herpes simple, por ejemplo, VHS1 o VHS2, virus del herpes humano 1, 3, 4, 5 o 6;

En una realización preferida, la partícula viral puede ser o puede derivarse de un virus *Adenoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae* o *Poxviridae*. En una realización particularmente preferida, la partícula viral puede ser o puede derivarse de un adenovirus, virus de la variolovacuna, virus de la gripe, o virus del sarampión.

Las partículas similares a virus (VLP) incluyen proteínas virales derivadas de las proteínas estructurales de un virus, pero carecen de ácido nucleico viral. Cuando se expresan en exceso, estas proteínas estructurales virales se auto-ensamblan espontáneamente en partículas. Las VLP son incompetentes en la replicación. En algunas realizaciones, las VLP son proteínas virales incorporadas dentro de una bicapa lipídica. Ejemplos de VLP incluyen VLP derivadas de fago, VLP de la proteína de la cápside mayor L1 del virus del papiloma humano (VPH), VLP de la proteína de la cápside del virus de Norwalk y VLP ensambladas de proteínas estructurales del virus de la gripe tales como proteína M1, proteína de hemaglutinina HA y proteína de neuraminidasa N1.

Las partículas virales pueden prepararse usando técnicas convencionales muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, puede prepararse un virus infectando células huésped cultivadas con la cepa de virus que va a usarse, permitiendo que la infección progrese de forma que el virus se replique en las células cultivadas y pueda ser liberado por métodos convencionales conocidos en la técnica para recoger y purificar virus.

### Derivados de glicina

El excipiente es una N,N-di(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)- o N,N,N-tri(alquilo C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>)-glicina o una sal o un éster fisiológicamente aceptable de las mismas. El grupo alquilo normalmente es un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>. Grupos alquilo preferidos están seleccionados de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y terc-butilo. Metilo y etilo son particularmente preferidos.

Derivados de glicina preferidos para su uso en la invención son N,N-dimetilglicina, N,N,N-trimetilglicina y sales fisiológicamente aceptables y ésteres de las mismas. La N,N-dimetilglicina también se llama dimetilglicina (DMG) o ácido 2-(dimetilamino)-acético. La N,N,N-trimetilglicina se llama trimetilglicina (TMG) por brevedad y se ha mencionado anteriormente como un compuesto de betaína.

La sal normalmente es una sal con un ácido fisiológicamente aceptable y así incluye aquellas formadas con un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico o sulfúrico o un ácido orgánico tal como ácido cítrico, tartárico, málico, maleico, mandélico, fumárico o metanosulfónico. Se prefiere la sal de clorhidrato.

- 5 El éster normalmente es un éster de alquilo C<sub>1-6</sub>, preferentemente un éster de alquilo C<sub>1-4</sub>. El éster puede, por tanto, ser el éster de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo o terc-butilo. Se prefiere éster de etilo.

### Soluciones que contienen derivados de glicina N-alkilados y compuestos de sulfona

#### 10 1. Derivados de glicina N-alkilados

El derivado de glicina N-alkilado es una N,N-di(alquil C<sub>1-6</sub>)- o N,N,N-tri(alquil C<sub>1-6</sub>)-glicina. El grupo alquilo normalmente es un grupo alquilo C<sub>1-4</sub>. Grupos alquilo preferidos están seleccionados de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y terc-butilo. Metilo y etilo son particularmente preferidos.

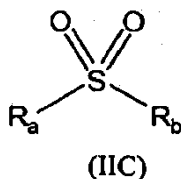
- 15 Derivados de glicina preferidos para su uso en la invención son N,N-dimetilglicina, N,N,N-trimetilglicina. La N,N-dimetilglicina también se llama dimetilglicina (DMG) o ácido 2-(dimetilamino)-acético. La N,N,N-trimetilglicina se llama trimetilglicina (TMG).

20 Puede emplearse una sal fisiológicamente aceptable o éster de un derivado de glicina N-alkilado. Así:

- La sal normalmente es una sal con un ácido fisiológicamente aceptable y así incluye aquellas formadas con un ácido inorgánico tal como ácido clorhídrico o sulfúrico o un ácido orgánico tal como ácido cítrico, tartárico, málico, maleico, mandélico, fumárico o metanosulfónico. Se prefiere la sal de clorhidrato.
- 25 - El éster normalmente es un éster de alquilo C<sub>1-6</sub>, preferentemente un éster de alquilo C<sub>1-4</sub>. El éster puede, por tanto, ser el éster de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo o terc-butilo. Se prefiere éster de etilo.

#### 2. Compuestos de sulfona

30 El compuesto de sulfona es un compuesto de fórmula (IIC):



35 en la que R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> representan independientemente alquilo C<sub>1-6</sub>, por ejemplo alquilo C<sub>1-4</sub>. Grupos alquilo preferidos están seleccionados de metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, isobutilo y terc-butilo. Metilo y etilo son particularmente preferidos. Un compuesto de sulfona preferido es metilsulfonilmetano (MSM), que también se conoce como dimetilsulfona (DMSO<sub>2</sub>).

### Azúcares

40 Azúcares adecuados para su uso en la presente invención incluyen azúcares reductores tales como glucosa, fructosa, gliceraldehídos, lactosa, arabinosa y maltosa; y preferentemente azúcares no reductores tales como sacarosa y rafinosa. El azúcar puede ser un monosacárido, disacárido, trisacárido, u otros oligosacáridos. El término "azúcar" incluye alcoholes de azúcar.

45 Se prevén monosacáridos tales como galactosa y manosa; disacáridos tales como sacarosa, lactosa y maltosa; trisacáridos tales como rafinosa; y tetrasacáridos tales como estaquiosa. También son adecuadas trehalosa, umbeliferosa, verbascosa, isomaltosa, celobiosa, maltulosa, turanosa, melecitosa y melibiosa para su uso en la presente invención. Un alcohol de azúcar adecuado es manitol.

50 La preservación de la actividad viral es particularmente eficaz cuando se usan dos o más azúcares. Pueden usarse dos, tres o cuatro azúcares. Preferentemente, se usan los dos azúcares sacarosa y rafinosa. La sacarosa es un disacárido de glucosa y fructosa. La rafinosa es un trisacárido compuesto de galactosa, fructosa y glucosa.

### 55 Disolvente acuoso

El disolvente acuoso es generalmente agua. Se usa generalmente agua pura tal como agua para inyecciones. Alternativamente, puede usarse solución salina fisiológica.

60

**Otros componentes**

La solución acuosa puede tamponarse. Puede usarse cualquier tampón fisiológicamente aceptable adecuado tal como un tampón fosfato. Normalmente, el pH se ajustará a de 4 a 9, preferentemente entre 5 y 8, y especialmente de aproximadamente pH 6,5 a 7,5. El pH exacto dependerá, por ejemplo, de la estabilidad en solución acuosa de las partículas virales.

Para fines de estabilidad, las soluciones de la presente invención deben protegerse de la contaminación y el crecimiento microbianos. Un conservante puede, por tanto, estar presente, por ejemplo en una cantidad del 0,001 al 1 % en peso. Ejemplos de agentes antimicrobianos farmacéuticamente aceptables que pueden usarse en la formulación incluyen:

- compuestos de amonio cuaternario (por ejemplo cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, cetrimida y cloruro de cetilpiridinio);
- agentes mercuriales (por ejemplo, nitrato fenilmercuríco, acetato fenilmercuríco y timerosal);
- agentes alcohólicos (por ejemplo, clorobutanol, alcohol feniletílico y alcohol bencílico);
- ésteres antibacterianos (por ejemplo, ésteres de ácido para-hidroxibenzoico);
- agentes quelantes tales como edetato de disodio (EDTA); y
- otros agentes antimicrobianos tales como clorhexidina, clorocresol, ácido sórbico y sus sales y polimixina.

La presencia de un agente de ajuste de la tonicidad es algunas veces deseable para lograr la isotonicidad con líquidos corporales que producen niveles reducidos de irritación tras la administración a un paciente. Ejemplos de agentes de ajuste de la tonicidad adecuados son cloruro sódico, dextrosa y cloruro de calcio. El agente de ajuste de la isotonicidad se añadirá deseablemente en una cantidad suficiente para lograr esta función. Preferentemente, el agente de ajuste de la tonicidad está presente en una cantidad de entre el 0,1 y el 10 % en peso.

Otros aditivos pueden estar presentes también tales como agentes co-solubilizantes y adyuvantes. Un adyuvante está generalmente presente cuando una solución de la invención se usa como una vacuna. El adyuvante se usa con el fin de aumentar la potencia de la vacuna y/o modular las respuestas inmunitarias humorales y celulares.

Adyuvantes adecuados incluyen, pero no se limitan a, sales minerales (por ejemplo, hidróxido de aluminio ("alumbre"), fosfato de aluminio, fosfato de calcio), adyuvantes en partículas (por ejemplo, virosomas, ISCOM (complejo estructurado de saponinas y lípidos)), derivados microbianos (por ejemplo, MPL (monofosforil lípido A), motivos CpG, toxinas modificadas que incluyen adyuvantes de TLR tales como flagelina), derivados de planta (por ejemplo, saponinas (QS-21)) y adyuvantes inmunoestimulantes endógenos (por ejemplo, citocinas y cualquier otra sustancia que actúe de agentes inmunoestimulantes para potenciar la eficacia de la vacuna).

**Producción de soluciones de la invención**

Pueden prepararse soluciones de la invención mezclando las partículas virales y otros componentes en cualquier orden conveniente en el disolvente acuoso seleccionado. Las partículas virales se proporcionan en la cantidad requerida, por ejemplo en una cantidad de dosificación unitaria. Una cantidad farmacéuticamente eficaz de las partículas virales puede así proporcionarse en la solución.

Generalmente, una preparación de las partículas virales se mezcla con una solución acuosa del (de los) excipiente(s) y opcionalmente uno o más azúcares. Los componentes de la solución pueden mezclarse bajo condiciones estériles. Alternativamente, los componentes de la solución pueden mezclarse primero y esterilizarse la solución resultante. Por ejemplo, el (los) excipiente(s) y/o azúcares opcionales pueden añadirse durante la fabricación de partículas virales, de manera que las partículas virales se estabilicen durante la fabricación, además de en el producto final. En algunos casos, sin embargo, puede desearse eliminar el (los) excipiente(s) y/o azúcares opcionales en una etapa de purificación antes de la formulación del producto final.

La solución con la que las partículas virales se mezclan puede tamponarse o la solución puede tamponarse después de la mezcla con las partículas virales. Puede ser una solución acuosa de HEPES, tamponada con fosfato, tamponada con Tris o pura. El pH puede ajustarse según se desee. Normalmente, una solución tendrá un pH de 4 a 9, preferentemente de 5 a 8, y especialmente aproximadamente pH 6,5 a 7,5.

El excipiente y, opcionalmente uno o más azúcares, están presentes a concentraciones que proporcionan soluciones de estabilidad durante el almacenamiento requerida. El excipiente puede ser un excipiente de la invención como se define en el presente documento. Concentraciones adecuadas pueden determinarse y optimizarse por experimentación rutinaria. Las concentraciones usadas en un caso particular dependerán de varios factores que incluyen:

- las partículas virales particulares;
- el excipiente que está siendo usado;
- si están presentes uno o más azúcares y, si es así, la identidad del o de cada azúcar.



El excipiente y azúcar(es) pueden estar presentes en cantidades que producen interacciones sinérgicas entre el excipiente y el (los) azúcar(es). Por ejemplo, pueden surgir interacciones sinérgicas entre (a) sulfonas tales como MSM y rafinosa, y (b) N,N-dialquilglicinas tales como DMG y sacarosa. Pueden determinarse concentraciones adecuadas y optimizarse por experimentación rutinaria.

5 La concentración del compuesto de derivado de glicina o sal fisiológicamente aceptable o éster del mismo o compuesto de fórmula (IIC) o sal fisiológicamente aceptable o éster del mismo en la solución acuosa está generalmente en el intervalo de 0,001 M a 2,5M y más especialmente de 0,01 M a 2,5 M. Por ejemplo, el intervalo de concentración puede ser de 0,1 M a 2,5 M. La concentración particular del compuesto de derivado de glicina o sal fisiológicamente aceptable o éster del mismo o compuesto de fórmula (IIC) o sal fisiológicamente aceptable o éster del mismo que se emplea dependerá de varios factores que incluyen las partículas virales; el compuesto de derivado de glicina particular o sal fisiológicamente aceptable o éster del mismo o compuesto de fórmula (IIC) o sal fisiológicamente aceptable o éster del mismo que se usa; si están presentes uno, dos o más azúcares y la identidad del (de los) azúcar(es).

15 La concentración de una N,N-dialquil- o N,N,N-trialquil-glicina o una sal o un éster fisiológicamente aceptable de las mismas en la solución acuosa está generalmente en el intervalo de 0,1 mM a 3 M o de 1 mM a 2M. La concentración puede ser de 1 mM a 1,5 M o de 5 mM a 1 M. Concentraciones preferidas son de 7 mM a 1,5 M o de 0,07 M a 0,7 M. La concentración particular de una N,N-dialquil- o N,N,N-trialquil-glicina o una sal o un éster fisiológicamente aceptable de las mismas que se emplea dependerá de varios factores que incluyen las partículas virales; si se usa uno o más azúcares y, si es así, el tipo de azúcar(es) particular(es) usado(s). Así:

- Concentraciones preferidas de la N,N-dialquil- o N,N,N-trialquil-glicina o una sal o un éster fisiológicamente aceptable de las mismas cuando no está presente azúcar son de 5 mM a 1,5 M o de 7 mM a 1 M o a 0,7 M. Concentraciones más preferidas son de 0,023 M a 0,7 M, o de 0,07 M a 0,7 M, tal como aproximadamente 0,07 M.
- Concentraciones preferidas de una N,N-dialquil- o N,N,N-trialquil-glicina o una sal o un éster fisiológicamente aceptable de las mismas cuando están presentes uno o más azúcares son generalmente más bajas y en el intervalo de 1 mM a 1 M o de 5 mM a 1 M. Concentraciones más preferidas son de 0,007 M a 0,7 M tal como aproximadamente 0,007 M.

Los componentes están presentes a concentraciones que proporcionan soluciones de la estabilidad durante el almacenamiento requerida. Pueden determinarse concentraciones adecuadas y optimizarse por experimentación rutinaria. El derivado de glicina N-alquilado o sal o un éster del mismo y el compuesto de sulfona de fórmula (IIC) pueden así estar presentes en cantidades que producen sinergia. Las concentraciones usadas en un caso particular dependerán de varios factores que incluyen:

- las partículas virales particulares que van a estabilizarse;
- el excipiente que está siendo usado;
- si están presentes uno o más azúcares y, si es así, la identidad del o de cada azúcar.

En particular:

- la concentración del derivado de glicina N-alquilado o sal o un éster del mismo en la solución acuosa para el secado está generalmente en el intervalo de 0,1 mM a 3 M o de 1 mM a 2 M. La concentración puede ser de 1 mM a 1,5 M o de 5 mM a 1 M. Concentraciones preferidas son de 7 mM a 1,5 M, de 0,07 M a 0,7 M, 0,1 M a 1,5 M o de 0,5 M a 1,25 M, y/o
- la concentración del compuesto de sulfona de fórmula (IIC) en la solución acuosa para el secado está generalmente en el intervalo de 0,1 mM a 3 M, de 1 mM a 2 M o de 0,2 mM a 1 M tal como de 0,35 mM a 1 M, de 3,5 mM a 0,5 M, de 0,035 M a 0,5 M o de 0,035 M a 0,25 M. La concentración puede ser de 0,1 M a 1,5 M o de 0,5 M a 1,25 M.

Cuando está presente en las soluciones de la invención, la concentración de azúcar o la concentración total de azúcares es al menos 0,01 M, normalmente hasta saturación. Generalmente, la concentración de azúcar es al menos 0,1 M, al menos 0,2 M o al menos 0,5 M hasta saturación, por ejemplo, saturación a temperatura ambiente o hasta 3 M, 2,5 M o 2 M. La concentración de azúcar puede, por tanto, oscilar de, por ejemplo, 0,1 M a 3 M o 0,2 M a 2 M. Alternativamente, la concentración de azúcar o la concentración total de azúcar si está presente más de un azúcar puede, por tanto, oscilar de 0,08 M a 3 M, de 0,15 M a 2 M o de 0,2 M a 1 M. Un intervalo adecuado es de 0,05 a 1 M.

Cuando está presente más de un azúcar en las soluciones de la invención, preferentemente uno de aquellos azúcares es sacarosa. La sacarosa puede estar presente a una concentración de 0,05 M, 0,1 M, 0,25 M o 0,5 M hasta saturación, por ejemplo, saturación a temperatura ambiente o hasta 3 M, 2,5 M o 2 M.

La relación de la concentración molar de sacarosa con respecto a la concentración molar del (de los) otro(s) azúcar(es) normalmente es de 1:1 a 20:1, tal como de 5:1 a 15:1. En el caso cuando están presentes dos azúcares,

y en particular cuando están presentes sacarosa y rafinosa, por tanto, la relación de concentraciones molares de sacarosa normalmente es de 1:1 a 20:1 tal como de 5:1 a 15:1 y preferentemente aproximadamente 10:1. Soluciones particularmente preferidas contienen los siguientes componentes:

- 5 - Sacarosa a una concentración de 0,8 M a 1,2 M, por ejemplo aproximadamente 1 M; TMG a una concentración de 0,8 a 1,2 M, por ejemplo aproximadamente 1 M; y/o rafinosa a una concentración de 200 a 400 mM, por ejemplo aproximadamente 300 mM. Normalmente, una solución tal comprende MVA.
- 10 - Sacarosa a una concentración de 0,8 M a 1,2 M, por ejemplo aproximadamente 1 M; y/o MSM a una concentración de 0,75 a 1,15 M, por ejemplo aproximadamente 0,95 M. A estas concentraciones puede surgir una interacción sinérgica entre MSM y sacarosa. Normalmente, una solución tal comprende adenovirus.
- 15 - Sacarosa a una concentración de 0,3 M a 0,7 M, por ejemplo aproximadamente 0,5 M; DMG a una concentración de 0,2 a 0,6 M, por ejemplo aproximadamente 0,4 M; y/o rafinosa a una concentración de 200 a 400 mM, por ejemplo aproximadamente 275 mM. A estas concentraciones puede surgir una interacción sinérgica entre DMG y rafinosa. Normalmente, una solución tal comprende adenovirus.

El pH de una solución de la invención puede ajustarse según se desee. Normalmente, una solución tendrá un pH de 4 a 9, preferentemente de 5 a 8 y especialmente aproximadamente pH 6,5 a 7,5.

20 Una solución de la invención está libre de pirógenos. La solución está así esterilizada. Una solución puede ser esterilizada pasándola a través de un filtro esterilizante. La solución esterilizada puede entonces introducirse en recipientes, tales como viales, que entonces se cierran herméticamente. Alternativamente, puede tener lugar la esterilización, por ejemplo, por esterilización en autoclave después de que la solución haya sido sellada en un recipiente.

25 La solución puede así proporcionarse en un vial sellado, ampolla, jeringa, cartucho, bolsa flexible o botella de vidrio. Como parenteral de volumen pequeño (SVP), puede proporcionarse en un cartucho desechable, jeringa desechable, vial, ampolla o bolsa flexible. Como parenteral de volumen grande (LVP) puede proporcionarse en un vial, bolsa flexible, botella de vidrio o, en algunos casos, como una jeringa desechable.

30 Preferentemente, los recipientes son viales con tapones no reactivos. El tapón puede estar recubierto u orientado a Teflon™. Se contemplan tapones de caucho de silicona u otros tapones no reactivos.

35 Los cartuchos, jeringas, viales y ampollas están normalmente compuestos de vidrio de tipo I o II, o polipropileno. Las bolsas flexibles normalmente se construyen con plástico multicapa. Los tapones y tabiques en cartuchos, jeringas y viales normalmente están compuestos de materiales elastoméricos. Los puertos de entrada (medicación) y salida (administración) para bolsas flexibles pueden ser materiales plásticos y/o elastoméricos. Puede usarse una envoltura completa con bolsas flexibles para retardar la pérdida de disolvente y para proteger el sistema de embalaje flexible de la manipulación brusca.

40 Las soluciones de la invención pueden usarse según se desee, dependiendo de las partículas virales en solución. La solución puede ser extraída de un envase sellado, por ejemplo, por una jeringa e inyectarse en un paciente por una vía adecuada. La solución puede así administrarse por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Una solución puede administrarse alternativamente por infusión. La solución puede diluirse antes de la administración.

#### **Preservación de partículas virales durante la fabricación**

50 En algunas circunstancias, puede desearse el uso del excipiente de la invención durante la fabricación de una solución de partículas virales, con el fin de que las partículas virales se preserven o estabilicen durante el procedimiento de fabricación. Esto puede aumentar el rendimiento del procedimiento.

55 Normalmente, el excipiente de la invención será retenido en la solución de partículas virales y así en el producto final. Esto puede ser ventajoso, ya que el excipiente de la invención continuará estabilizando las partículas virales en el producto final.

60 Alternativamente, puede haber algunas situaciones en las que sea preferible eliminar el excipiente de la invención en una etapa de purificación. Tal eliminación puede llevarse a cabo por cualquier técnica de purificación adecuada conocida para aquellos expertos en la materia, tal como cromatografía. El método de purificación exacto dependerá del excipiente que se use y las técnicas adecuadas pueden ser fácilmente seleccionadas por aquellos expertos en la materia.

65 Una vez se ha eliminado el excipiente, la solución de partículas virales normalmente se sella en un recipiente, tal como vial, ampolla, jeringa, cartucho, bolsa flexible o botella de vidrio.

Preferentemente, la solución se esteriliza, por ejemplo pasando la solución a través de un filtro esterilizante, antes de introducir la solución en el recipiente. Alternativamente, puede ser preferible realizar el procedimiento de fabricación y purificación en condiciones estériles, tal que el producto final sea estéril.

- 5 La concentración del excipiente de la invención es preferentemente como se explica anteriormente en "Producción de soluciones de la invención" anteriormente. La concentración del (de los) azúcar(es), donde estén presentes, también es preferentemente como se explica en "Producción de soluciones de la invención" anteriormente.

#### Medición de la preservación de partículas virales

- 10 La preservación en relación con las partículas virales se refiere a la resistencia de la partícula viral a degradación física o química y/o pérdida de actividad biológica.

- 15 Métodos de ensayo de la actividad viral, tales como infectividad y/o inmunogenicidad, son muy conocidos para aquellos expertos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, crecimiento de un virus en un cultivo celular, detección de anticuerpo específico de virus en sangre, capacidad para provocar respuestas de linfocitos T y/o B, detección de antígenos virales, detección de ADN o ARN codificado por virus, u observación de partículas de virus usando un microscopio.

- 20 Además, la presencia de un virus da lugar a cambios morfológicos en la célula huésped, que pueden medirse para dar una indicación de la actividad viral. Cambios detectables tales como estos en la célula huésped debido a infección viral se conocen como efecto citopático. Los efectos citopáticos pueden consistir en redondeo de células, desorientación, hinchamiento o encogimiento, muerte y desprendimiento de la superficie. Muchos virus inducen la apoptosis (muerte celular programada) en células infectadas, medible por técnicas tales como el ensayo TUNEL (marcado de extremos cortados por dUTP mediado por uridín desoxinucleotidil transferasa terminal) y otras técnicas muy conocidas para aquellos expertos en la materia.

- 30 Los virus también pueden afectar la regulación de la expresión de los genes de la célula huésped y estos genes pueden analizarse para dar una indicación de si está presente actividad viral o no. Tales técnicas pueden implicar la adición de reactivos al cultivo celular para completar una reacción enzimática o química con un producto de expresión viral. Además, puede modificarse el genoma viral con el fin de potenciar la detección de la infectividad viral. Por ejemplo, el genoma viral puede ser genéticamente modificado para expresar un marcador que puede ser fácilmente detectado por microscopía de contraste de fases, microscopía de fluorescencia o por obtención de imágenes por rayos X. El marcador puede ser una proteína fluorescente expresada tal como GFP (proteína verde fluorescente) o una enzima expresada que puede participar en una reacción colorimétrica o de radiomarcado. El marcador también podría ser un producto génico que interrumpe o inhibe una función particular de las células que se prueban.

- 40 Puede usarse un ensayo para las unidades formadoras de placa para medir la infectividad viral y para indicar el título viral. En este ensayo, se cultivan células huésped adecuadas sobre una superficie plana hasta que forman una monocapa de células que cubre una botella de plástico o placa. La selección de una célula huésped particular dependerá del tipo de virus. Ejemplos de células huésped adecuadas incluyen, pero no se limitan a, CHO, BHK, MDCK, 10T1/2, células WEHI, COS, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERO, WI38, MRC5, A549, HT1080, 293, B-50, 3T3, NIH3T3, HepG2, Saos-2, Huh7, HEK293 y células HeLa. La monocapa de células huésped se infecta entonces con las partículas virales. El medio líquido se sustituye por un semi-sólido de manera que produzca partículas de virus, como resultado de que una infección no puede alejarse del sitio de su producción. Se produce una placa cuando una partícula de virus infecta una célula, se replica, y entonces aniquila esa célula. Una placa se refiere a un área de células en la monocapa que muestra un efecto citopático, por ejemplo que aparecen redondas y más oscuras que otras células bajo el microscopio, o como puntos blancos cuando se visualizan a ojo; el centro de la placa puede carecer de células debido a la lisis inducida por virus. El virus recientemente replicado infecta las células de alrededor y también son aniquiladas. Este procedimiento puede repetirse varias veces. Las células se tiñen entonces con un colorante tal como azul de metileno, que tiñe solo las células vivas. Las células muertas en la placa no se tiñen y aparecen como áreas sin teñir sobre un fondo coloreado.

- 55 Cada placa es el resultado de infección de una célula por un virus, seguido de replicación y extensión de ese virus. Sin embargo, los virus que no aniquilan células pueden no producir placas. Una placa se refiere a un área de células en una monocapa que muestra un efecto citopático, por ejemplo que aparecen redondas y más oscuras que otras células bajo el microscopio, o como manchas blancas cuando se visualizan a ojo; el centro de la placa puede carecer de células debido a la lisis inducida por virus. Una indicación de título viral se da midiendo las "*unidades formadoras de placa*" (UFP). Los niveles de infectividad viral pueden medirse en una muestra de material biológico preservada según la presente invención y en comparación con muestras de control tales como virus recién recogidos o muestras sometidas a desecación y/o variación térmica sin adición de la mezcla de preservación de la presente invención.

- 65 Algunos tipos de partículas virales de la invención, tales como proteínas virales, VLP, o algunos virus inactivados, no tienen la capacidad de formar placas en el ensayo de placas. En este caso, la preservación puede medirse por otros

métodos tales como métodos para determinar la inmunogenicidad, que son muy conocidos para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, se conocen en la técnica ensayos *in vivo* e *in vitro* para medir respuestas inmunitarias de anticuerpos o de huéspedes mediadas por células y adecuadas para su uso en la presente invención. Por ejemplo, puede medirse una respuesta inmunitaria basada en anticuerpo comparando la cantidad, avidéz y distribución del isotipo de los anticuerpos del suero en un modelo animal, antes y después de la inmunización usando la partícula viral preservada de la invención.

**Usos de las partículas virales preservadas de la invención**

Las soluciones de la invención pueden usarse según se desee. La solución puede sacarse de un envase sellado, por ejemplo, por una jeringa e inyectarse en un paciente por una vía adecuada. La solución puede así administrarse por inyección subcutánea, intramuscular, intravenosa o intraperitoneal. Una solución puede alternativamente administrarse por infusión. La solución puede diluirse antes de la administración.

**Vacunas**

Las soluciones de la presente invención pueden encontrar uso como vacunas. Por ejemplo, las soluciones que contienen virus muertos completos, virus atenuados vivos, virus químicamente inactivados, VLP o vectores virales vivos son adecuadas para su uso como vacunas. Como vacuna pueden usarse las partículas virales como antígenos o para codificar antígenos tales como proteínas virales para el tratamiento o la prevención de varias afecciones que incluyen, pero no se limitan a, infección viral, secuelas de infección viral que incluyen, pero no se limitan a, toxicidad inducida por virus, cáncer y alergias. Tales antígenos contienen uno o más epítopes que estimularán el sistema inmunitario de un huésped para generar una respuesta específica de antígeno humoral y/o celular.

Una vacuna de la invención puede usarse para prevenir o tratar infección por virus tales como virus del papiloma humano (VPH), VIH, VHS2/VHS1, virus de la gripe (tipos A, B y C), virus paragripal, virus de la polio, virus VRS, rinovirus, rotavirus, virus de la hepatitis A, virus de Norwalk, enterovirus, astrovirus, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de la varicela-zóster, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, adenovirus, virus de la rubeola, virus linfotrópico T humano de tipo I (HTLV-I), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D, poxvirus y virus de la variolovacuna. La vacuna puede usarse además para proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada contra numerosas enfermedades veterinarias, tales como enfermedad de pies y boca (incluyendo serotipos O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1), coronavirus, lengua azul, virus de la leucemia felina, gripe aviar, virus de Hendra y de Nipah, pestivirus, parvovirus canino y virus de la diarrea viral bovina. En una realización, la vacuna es una vacuna de subunidad, conjugada o multivalente. Por ejemplo, la vacuna de la invención puede usarse para tratar infección por dos o más tipos diferentes de virus tales como sarampión, paperas y rubeola (por ejemplo, vacuna de MMR).

Para medir la preservación de la estabilidad de una vacuna preparada según la presente invención, la potencia de la vacuna puede medirse usando técnicas muy conocidas para aquellos expertos en la materia. Por ejemplo, la generación de una respuesta inmunitaria celular o humoral puede probarse en un modelo animal apropiado monitorizando la generación de anticuerpos o respuestas de células inmunitarias a la vacuna. La capacidad de las muestras de vacuna para desencadenar una respuesta inmunitaria puede compararse con vacunas no sometidas a la misma técnica de preservación.

**Vectores virales**

Puede usarse un virus o vector viral según la presente invención para transferir un gen heterólogo u otra secuencia de ácidos nucleicos a células diana. Adecuadamente, la secuencia heteróloga (es decir, el transgén) codifica una proteína o producto génico que es capaz de ser expresado en la célula diana. Transgenes adecuados incluyen genes indicadores deseables, genes terapéuticos y genes que codifican polipéptidos inmunogénicos (para su uso como vacunas). La terapia génica, un enfoque para el tratamiento o la prevención de enfermedades asociadas a expresión génica defectuosa, implica la inserción de un gen terapéutico en células, seguido de la expresión y producción de las proteínas requeridas. Este enfoque permite la sustitución de genes dañados o la inhibición de la expresión de genes no deseados. En particular, el virus o vector viral puede usarse en terapia génica para transferir un transgén terapéutico o gen que codifica polipéptidos inmunogénicos a un paciente.

En una realización preferida, la partícula viral es un vector viral vivo. Por "vector viral vivo" se indica un vector viral vivo que es no patógeno o de baja patogenicidad por las especies diana y en el que se han insertado uno o más genes que codifican antígenos que estimulan una respuesta inmunitaria protectora contra otros virus o microorganismos, un gen indicador o una proteína terapéutica. En particular, el ácido nucleico se introduce en el vector viral de tal forma que sea todavía capaz de replicarse, expresando así un polipéptido codificado por la secuencia de ácidos nucleicos insertada y, en el caso de una vacuna, provocando una respuesta inmunitaria en el animal huésped infectado. En una realización, el vector viral vivo es un vector viral vivo atenuado, es decir, se modifica para ser menos virulento (causante de enfermedad) que el virus no mutante.

La base de uso de virus recombinantes como posibles vacunas implica la incorporación de genes específicos de un organismo patógeno en el genoma de un virus no patógeno o atenuado. El virus recombinante puede entonces infectar células eucariotas específicas tanto *in vivo* como *in vitro*, y hacerlas que expresen la proteína recombinante.

5 Pueden preferirse vacunas de vector viral vivo derivadas por la inserción de secuencias codificantes de genes de organismos enfermos con respecto a vacunas atenuadas vivas, vacunas inactivadas, enfoques de subunidad o de ADN. Una de las características de seguridad más importantes de los vectores virales vivos es que los receptores pueden inmunizarse contra antígenos específicos de organismos patógenos sin exposición al propio agente de enfermedad. La seguridad se regula además por la selección de un vector viral que está tanto atenuado para el  
10 huésped como es incapaz de replicarse en el huésped, aunque todavía es capaz de expresar el antígeno heterólogo de interés. Una cepa de vacuna que tiene una historia de seguridad en la especie diana ofrece una característica de seguridad adicional. Se han desarrollado varios sistemas en los que el vector tiene delecionado genes esenciales y la preparación de la vacuna se lleva a cabo en sistemas de células que proporcionan la función que falta.

15 Puede usarse una variedad de vectores tales como vectores virales retrovirales, lentivirales, del virus del herpes, de poxvirus, adenovirales y adeno-asociados para la administración de genes heterólogos a células diana. El gen heterólogo de interés puede insertarse en el vector viral. Los vectores virales de la invención pueden comprender, por ejemplo, un vector de virus provisto de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión del gen heterólogo y opcionalmente un regulador del promotor. Por ejemplo, adenovirus útiles en la práctica de la  
20 presente invención pueden tener deleciones en la región E1 y/o E3 y/o E4, o pueden de otro modo ser maximizados para recibir ADN heterólogo.

El vector viral puede comprender un promotor constitutivo tal como un promotor del citomegalovirus (CMV), promotor del antígeno T grande del SV40, promotor LTR del virus de tumor mamario de ratón, promotor tardío principal del  
25 adenovirus (MLP), el promotor LTR del virus de tumor mamario de ratón, el promotor temprano del SV40, promotores de adenovirus tales como el promotor tardío principal del adenovirus (Ad MLP), promotores del VHS (tales como los promotores IE del VHS), promotores del VPH tales como la región reguladora aguas arriba del VPH (URR) o promotor del virus del sarcoma de Rous, junto con otras secuencias de ácidos nucleicos virales operativamente unidas al gen heterólogo de interés. También pueden usarse promotores específicos de tejido o  
30 inducibles para controlar la expresión del gen heterólogo de interés. También pueden seleccionarse promotores para ser compatibles con la célula huésped para la que se diseña la expresión.

El vector viral también puede comprender otros elementos moduladores de la transcripción tales como potenciadores. Los potenciadores se definen ampliamente como un agente que actúa en cis, que cuando está  
35 operativamente unido a un promotor/secuencia de genes, aumentará la transcripción de esa secuencia de genes. Los potenciadores pueden funcionar desde posiciones que están mucho más lejos de una secuencia de interés que otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, promotores) y pueden operar cuando se posicionan en cualquier orientación con respecto a la secuencia de interés. Se han identificado potenciadores de varias fuentes virales, que incluyen virus del poliovirus, virus BK, citomegalovirus (CMV), adenovirus, virus simio 40 (SV40), virus del  
40 sarcoma de Moloney, virus del papiloma bovino y virus del sarcoma de Rous. Ejemplos de potenciadores adecuados incluyen el potenciador del gen temprano del SV40, el potenciador/promotor derivado de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous, y elementos derivados de CMV humano o murino, por ejemplo, elementos incluidos en la secuencia A del intrón del CMV.

45 El vector viral que contiene un gen heterólogo de interés puede entonces preservarse según el método de la invención antes del almacenamiento, someterse a técnicas de preservación adicionales tales como liofilización, o administración a un paciente o célula huésped.

Ácidos nucleicos que codifican polipéptidos conocidos por mostrar actividad antiviral, moléculas inmunomoduladoras  
50 tales como citocinas (por ejemplo TNF-alfa, interleucinas tales como IL-6, y IL-2, interferones, factores estimulantes de colonias tales como GM-CSF), adyuvantes y moléculas co-estimulantes y accesorias pueden incluirse en el vector viral de la invención. Alternativamente, tales polipéptidos pueden proporcionarse por separado, por ejemplo en la mezcla de preservación de la invención, o pueden administrarse simultáneamente, secuencialmente o por separado con vectores virales de la invención.

55 Preferentemente, el vector viral preservado de la invención puede introducirse en células huésped adecuadas usando una variedad de técnicas virales que se conocen en la técnica, tales como, por ejemplo, infección con vectores virales recombinantes tales como retrovirus, virus del herpes simple y adenovirus. Preferentemente, la administración del vector viral preservado de la invención que contiene un gen de interés está mediada por infección  
60 viral de una célula diana.

Se han desarrollado varios sistemas basados en virus para transfectar células de mamífero.

65 Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico recombinante seleccionada puede insertarse en un vector y encapsidarse como partículas retrovirales usando técnicas conocidas en la técnica. El virus recombinante puede entonces aislarse y administrarse a las células del sujeto tanto *in vivo* como *ex vivo*. Los vectores retrovirales

pueden basarse en el virus de la leucemia murina de Moloney (Mo-MLV). En un vector retroviral, uno o más de los genes virales (gag, pol y env) están generalmente sustituidos con el gen de interés.

5 Se conocen varios vectores de adenovirus. Comúnmente se usan los serotipos 2 y 5 del subgrupo C de adenovirus como vectores. Los adenovirus pueden ser un adenovirus humano o no humano. El genoma del adenovirus no mutante tiene aproximadamente 35 kb de los que hasta 30 kb pueden sustituirse con ADN extraño.

10 Hay cuatro unidades transcripcionales tempranas (E1, E2, E3 y E4) que tienen funciones reguladoras, y un transcrito tardío, que codifica proteínas estructurales. Los vectores de adenovirus pueden tener el gen E1 y/o E3 inactivado. El (Los) gen(es) ausente(s) pueden entonces suministrarse en trans tanto por un virus colaborador, plásmido, como integrarse en un genoma de célula colaboradora. Los vectores de adenovirus pueden usar un mutante sensible a la temperatura E2A o una delección de E4. Vectores de adenovirus mínimos pueden contener solo las repeticiones terminales invertidas (ITR) y una secuencia de encapsidación alrededor del transgén, siendo todos los genes virales necesarios proporcionados en trans por un virus colaborador. Así, vectores adenovirales adecuados incluyen vectores Ad4, Ad5, Ad7, Ad11, Ad14, Ad26, Ad35 y Ad36 y vectores de adenovirus de simio, preferentemente vectores Ad4, Ad5, Ad7, Ad35 y Ad36. Ad5 es el más comúnmente usado.

20 También pueden derivarse vectores virales de la familia de virus pox, que incluye virus de la variolovacuna y poxvirus aviares tales como vacunas de la viruela aviar. Por ejemplo, el virus de la variolovacuna modificado Ankara (MVA) es una cepa de virus de la variolovacuna que no se replica en la mayoría de los tipos de células, que incluyen tejidos humanos normales. Un vector de MVA recombinante puede, por tanto, usarse para administrar un polipéptido.

25 También pueden usarse tipos de virus adicionales tales como virus adeno-asociado (AAV) y virus del herpes simple (HSV) para desarrollar sistemas de vector adecuados.

#### *Administración*

30 Las soluciones según la presente invención pueden administrarse a un sujeto *in vivo* usando una variedad de vías y técnicas conocidas. Las soluciones son adecuadas para administración parenteral. Por ejemplo, las vacunas pueden proporcionarse como una solución inyectable, suspensión o emulsión y administrarse por vía parenteral, subcutánea, oral, epidérmica, intradérmica, intramuscular, interarterial, intraperitoneal, inyección intravenosa usando una aguja y jeringa convencionales, o usando un sistema de inyección de chorro líquido. Las vacunas pueden administrarse apicalmente a la piel o tejido mucoso, tal como por vía nasal, intratraqueal, intestinal, sublingual, rectal o vaginal, o proporcionarse como un espray finamente dividido adecuado para administración respiratoria o pulmonar.

Los siguientes ejemplos ilustran la invención.

#### 40 Estadística

En algunos de los ejemplos se calcularon los siguientes valores estadísticos:

45  $R^2$  = coeficiente de determinación. Una medida de la bondad del ajuste.  $R^2 < 0,5$  = baja significancia del modelo.  
 $Q^2$  = estimación de la precisión de la predicción. Una medida de la bondad de la predicción.  $Q^2$  debe ser  $> 0,1$  para un modelo significativo.  $Q^2$  debe ser  $> 0,5$  para un buen modelo.  $R^2 - Q^2 < 0,2$  a  $0,3$   
 Validez del modelo (MV) = "una prueba de diversos problemas del modelo". Validez del modelo  $< 0,25$  = indicador de problemas del modelo estadísticamente significativos, por ejemplo, valores atípicos, modelo incorrecto / transformación.  
 50 Reproducibilidad (Rep) = medida de la variación entre repeticiones en comparación con la variabilidad global. Reproducibilidad  $> 0,5$  implica significancia.

Se emplearon los siguientes materiales, equipo y técnicas, a menos que se establezca de otro modo en los Ejemplos 1 a 4:

#### 55 Materiales

Células HEK-293 (ECACC 85120602)  
 DMSO (Sigma D1435, Lote 118K1455)  
 60 Sacarosa (Sigma 16104, Lote 70040)  
 Rafinosa (Sigma R0250, Lote 039K0016)  
 PBS (Sigma D8662, Lote 118K2339)  
 Agua (Sigma W3500, Lote 8M0411)  
 Viales de vidrio de 5 ml (Adelphi Tubes VCD005)  
 65 Viales de vidrio de 2 ml (Adelphi Tubes VCDIN2R)  
 Tapones de liofilización de 14 mm (Adelphi Tubes FDIA14WGB)

- 5 Tapas de 14 mm (Adelphi Tubes CWPP14)  
 GFP de adenovirus (cat. de Vector Bio labs 1060)  
 Glicina (Sigma, G7126, 118K00181)  
 N,N-DMG (Sigma D1156; Lote 077K1856)  
 SMM (Sigma, 64382, 1339210)  
 TMG (Sigma, B2629, 1089K1201)

Equipo

- 10 Liofilizador Modulyo D (Thermofisher)  
 Vitrina de clase de seguridad II HERA (Thermofisher)  
 Estufa de incubación de CO<sub>2</sub> Binder (Binder)  
 Cámara de prueba de ciclado térmico APT line TM MK Binder (Binder)  
 Estufa de incubación Thermo Scientific MaxQ 4450 (Thermofisher)  
 15 Balanza KERN EW220-3NM (VWR)  
 Congelador a -45 °C Elcold (VWR)  
 Congelador a -80 °C serie Forma 900 (Thermofisher)  
 Lector de microplacas Sinergia HT (Biotek)

20 **Ejemplo 1**

Formulación de virus

25 Se usó adenovirus recombinante (Vector Biolabs) que expresa GFP (proteína verde fluorescente) potenciada bajo un promotor del CMV para facilitar la detección durante el ensayo.

30 En este estudio se probaron cuatro compuestos glicinérgicos y una tetina para la eficacia como conservante (de adenovirus) a una concentración final de 0,07-0,70 M, tanto en co-formulaciones con azúcares (sacarosa 1 M, rafinosa 100 mM) como en su ausencia. Los compuestos glicinérgicos probados fueron glicina, sarcosina (mono-metilglicina), DMG (Di-metilglicina), TMG (tri-metilglicina). La tetina probada fue SMM (S-metil-metionina). El virus se formuló con mezclas de excipiente con el fin de probar su eficacia en preservar la actividad viral durante un periodo de exposición térmica. Cada mezcla de excipientes más virus (véase la Tabla 1, a continuación) se preparó como una solución madre en PBS y se añadieron 300 µl a viales de vidrio de 5 ml apropiadamente marcados.

35 Tabla 1 - Sumario de tratamientos, cada sistema por triplicado. S = Sí, N= No. Donde la concentración de azúcares presentes = sacarosa 1 M, rafinosa 100 mM.

Excipiente	Conc. (M)	¿Azúcares?	Exposición térmica (°C)	Excipiente	Conc. (M)	¿Azúcares?	Exposición térmica (°C)
DMG	0,70	S	4	DMG	0,7	S	37
DMG	0,23	S	4	DMG	0,23	S	37
DMG	0,07	S	4	DMG	0,07	S	37
DMG	0,70	N	4	DMG	0,70	N	37
DMG	0,23	N	4	DMG	0,23	N	37
DMG	0,07	N	4	DMG	0,07	N	37
Glicina	0,70	S	4	Glicina	0,70	S	37
Glicina	0,23	S	4	Glicina	0,23	S	37
Glicina	0,07	S	4	Glicina	0,07	S	37
Glicina	0,70	N	4	Glicina	0,70	N	37
Glicina	0,23	N	4	Glicina	0,23	N	37
Glicina	0,07	N	4	Glicina	0,07	N	37
Sarcosina	0,70	S	4	Sarcosina	0,70	S	37
Sarcosina	0,23	S	4	Sarcosina	0,23	S	37
Sarcosina	0,07	S	4	Sarcosina	0,07	S	37
Sarcosina	0,70	N	4	Sarcosina	0,70	N	37
Sarcosina	0,23	N	4	Sarcosina	0,23	N	37
Sarcosina	0,07	N	4	Sarcosina	0,07	N	37
TMG	0,70	S	4	TMG	0,70	N	37
TMG	0,23	S	4	TMG	0,23	S	37

Excipiente	Conc. (M)	¿Azúcares?	Exposición térmica (°C)	Excipiente	Conc. (M)	¿Azúcares?	Exposición térmica (°C)
TMG	0,07	S	4	TMG	0,07	S	37
TMG	0,70	N	4	TMG	0,70	N	37
TMG	0,23	N	4	TMG	0,23	N	37
TMG	0,07	N	4	TMG	0,07	N	37
SMM	0,70	S	4	SMM	0,70	S	37
SMM	0,23	S	4	SMM	0,23	S	37
SMM	0,07	S	4	SMM	0,07	S	37
SMM	0,70	N	4	SMM	0,70	N	37
SMM	0,23	N	4	SMM	0,23	N	37
SMM	0,07	N	4	SMM	0,07	N	37
Ninguno	0,00	S	4	Ninguno	0,00	S	37
Ninguno	0,00	N	4	Ninguno	0,00	N	37

#### Exposición térmica

5 Se dispusieron tres duplicados de cada tratamiento a 4 °C, y otros 3 a 37 °C, durante un periodo de 7 días. En este momento todas las muestras se dispusieron a 4 °C hasta que fue práctico ensayarlos.

#### Ensayo de adenovirus

10 Se sembraron células permisivas al adenovirus (HEK 293, ECACC 85120602) en placas de cultivo celular de fondo plano de 96 pocillos (VWR, RU) a 10<sup>5</sup> células por ml (100 µl por pocillo) y se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de alcanzar el 90 % de confluencia, los viales que contenían el adenovirus más excipiente se sacaron del frigorífico y se produjeron diluciones 1 en 10, y 1 en 100, por dilución sucesiva en DMEM. Entonces se añadieron 100 µl de cada una de las diluciones resultantes (1 en 10 y 1 en 100) a los pocillos de la placa que contenían células HEK 293. Adicionalmente, se usó otra muestra de adenovirus, de la misma fuente y con el mismo título (en almacenamiento a -80 °C) en los tratamientos de excipiente, se descongeló y se usó para producir una serie de diluciones 1 en 10 (en DMEM). Las diluciones que oscilaban de 1 en 10 a 1 en 10<sup>6</sup> también se añadieron a pocillos individuales que contenían HEK 293. A las 48 horas, después de la inoculación, se contó el número de células GFP (proteína verde fluorescente) por pocillo usando microscopía fluorescente, y esto se convirtió posteriormente en ufp/ml de las muestras tratadas, teniendo en cuenta el volumen aplicado y la dilución del inóculo.

#### Resultados y discusión

##### Actividad viral recuperada después de 1 semana a 4 °C (Figura 1a y b) (glicinérgicos y SMM SIN azúcar añadido o CON azúcar añadido, respectivamente)

25 Después de una semana a 4 °C de las muestras adenovirales formuladas en PBS solo, la actividad viral recuperada fue un 46 % del título original. Sin embargo, la formulación junto con azúcares (sacarosa 1 M, rafinosa 100 mM) produjo una mejora de la recuperación al 69 %. Todas las formulaciones de adenovirus junto con glicinérgicos o SMM y en ausencia de azúcares produjeron una recuperación del 52-71 %. Aunque esto representó una mejora significativa con respecto a PBS, incluso las mejores formulaciones glicinérgicas o de SMM dieron una recuperación que es solo equivalente a la de los azúcares (véase la Figura 1a). Cuando los glicinérgicos o SMM se formularon junto con azúcares, la actividad viral recuperada no se potenció adicionalmente (50-72 %). En ambos casos (es decir, glicinérgicos o SMM en presencia o ausencia de azúcares) no hubo dependencia clara de la dosis, es decir, no hubo una clara correlación entre la actividad viral recuperada y la concentración de glicinérgico o SMM (véase la Figura 1b).

##### La actividad viral recuperada después de 1 semana a 37 °C (Figura 1c y d) (glicinérgicos y SMM SIN azúcar añadido o CON azúcar añadido, respectivamente)

40 Después de una semana a 37 °C de las muestras adenovirales formuladas en PBS solo, la actividad viral recuperada fue del 25 % del título original. La formulación junto con azúcares (sacarosa 1 M, rafinosa 100 mM) potenció la recuperación al 38 %.

45 El uso de glicinérgicos en el extremo más alto del intervalo de concentración probado y como el único excipiente produjeron eficacia mejorada con respecto a PBS solo, y en cada caso se observó una fuerte correlación positiva entre la concentración de glicinérgico y la actividad viral recuperada. Con respecto al intervalo de concentración probado (0,07 a 0,70 M), la actividad se potenció del 29 % al 45 % en el caso de glicina, del 29 % al 49 % con



sarcosina, del 27 % al 41 % con DMG, y del 21 a 45 % con TMG. Con cada glicinérgico en el intervalo de concentración probado, los mejores resultados se lograron con la concentración más alta probada y fue posible recuperar la actividad viral como alta o mayor que cuando se usan azúcares como el único formulante (véase la Figura 1c).

El uso de los siguientes glicinérgicos, glicina, sarcosina y DMG, a través del intervalo de concentración probado completo junto con azúcares produjo eficacia mejorada con respecto a PBS solo. Con la excepción de las concentraciones de sarcosina y DMG más bajas, la recuperación también fue superior a la de los azúcares solos. En cada caso se observó una fuerte correlación positiva entre la concentración de glicinérgico y la actividad viral recuperada. Por encima del intervalo de concentración probada (0,07 a 0,70 M) la actividad se potenció del 41 % al 54 % en el caso de glicina, del 37 % al 56 % con sarcosina y del 37 % al 52 % con DMG (véase la Figura 1d).

Una excepción fue que cuando TMG se co-formuló con azúcares se observó algún tipo de efecto antagonista. Esto produjo una correlación negativa entre la concentración de TMG y la actividad recuperada. La actividad varió con la concentración de TMG del 45 % a 0,07 M al 38,7 % a 0,70M. Estos datos sugieren que los azúcares alteran la concentración óptima de TMG, ya que se observa una interacción positiva entre TMG y azúcares a 0,07 M y una negativa a 0,70M, pero la actividad recuperada nunca supera la que se ha observado como posible con TMG solo (véase la Figura 1d). Finalmente, SMM preserva la actividad adenoviral cuando se usa como el único formulante en el intervalo 0,07 M a 0,23 M (la actividad recuperada es del 33 % y 43 %, respectivamente).

### **Ejemplo 2 - Estabilización de adenovirus**

Se emplearon los siguientes materiales, equipos y técnicas, a menos que se establezca de otro modo en el ejemplo 2 y Ejemplo 3:

#### **Materiales**

##### *Productos químicos*

Dimetilglicina (DMG)	(Sigma D1156, Lote 077K1856)
Dimetilsulfona (MSM)	(Sigma M81705, Lote 0001452516)
Medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)	(Sigma D5796, Lote RNBB1139)
Suero bovino fetal (FBS)	(Sigma F7524, Lote 109K3395)
Penicilina-estreptomicina (PS)	(Sigma P4458, Lote 0409M00393)
Solución salina de citrato de sodio (SSC)	(Sigma S6639, Lote 020M8404)
Sacarosa	(Sigma 16104, Lote SZB90120)
Agua	(Sigma W3500, Lote RNBB1139)

##### *Productos biológicos*

Adenovirus	(cat. de Vector Biolabs 1060)
Línea celular BHK-21	(ECCAC CB2857)
HEK 293	(ECACC 85120602)

##### *Otros*

Viales de vidrio de 5 ml	(Adelphi Tubes VCD005)
Tapones de liofilización de 14 mm	(Adelphi Tubes FDIA14WGB)
Tapas de 14 mm	(Adelphi Tubes CWPP14)

##### *Equipo*

Vitrina de clase de seguridad II HERA	(Thermo Fisher, EQP# 011 y 012)
Microscopio invertido LED DMIL	(Leica, EQP#062)
Estufa de incubación de CO <sub>2</sub> Binder	(Binder, EQP#014)
Congelador a -80 °C serie Forma 900	(Thermofisher, EQP#015)
Balanza ATL-84-1 Atlion	(Acculab, EQP#088)
Estufa de incubación a 37 °C IP250	(LTE, EQP#016)

#### *Preparación de preparaciones de virus líquidas*

Se sacó adenovirus humano recombinante Ad5 (Vector Biolabs) que expresa GFP (proteína verde fluorescente) potenciada bajo un promotor del CMV, y con un título (pre-congelación) de  $6,7 \times 10^5$  ufp/ml en SSC, de almacenamiento a -80 °C y se dejó que se descongelara. Se añadieron alícuotas de 50 µl a viales de vidrio de 5 ml. A estas muestras de virus de 50 µl se añadieron 250 µl de una mezcla de formulación compuesta de DMG, MSM y opcionalmente sacarosa. Cada mezcla de formulación se enrasó en SSC. La concentración de DMG, MSM y sacarosa en cada formulación después de la adición a la muestra de virus se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2 – Formulaciones probadas

Formulación	Sacarosa (M)	MSM (M)	DMG (M)
1	0,00	0,10	0,10
2	0,15	0,10	0,10
3	0,00	1,00	0,10
4	0,15	1,00	0,10
5	0,08	0,55	0,55
6	0,08	0,55	0,55
7	0,08	0,55	0,55
8	0,00	0,10	1,00
9	0,15	0,10	1,00
10	0,00	1,00	1,00
11	0,15	1,00	1,00

5 Los viales se taparon con tapón y con tapa (tapa roscada) antes de colocarse a 37 °C para exposición térmica. La exposición térmica fue durante 7 días, después de lo cual todos los viales se devolvieron a 4 °C hasta que fue práctico ensayarlos.

#### *Ensayo para adenovirus infecciosos*

10 Se sembraron placas de cultivo celular de fondo plano de 96 (VWR, RU) con células HEK 293 (ECACC 85120602) a  $10^5$  células por ml (100 µl por pocillo) y se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de alcanzar el 90 % de confluencia, las células se inocularon.

15 Se reconstituyeron viales que contenían adenovirus más excipiente en 300 µl de SSC. Entonces se hizo una etapa de dilución 1 en 10 tomando 20 µl del vial reconstituido y añadiendo a 180 µl de medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM). Se realizó otra dilución 1 en 100 (de la muestra original) tomando 20 µl de la dilución 1 en 10 y añadiéndola a 180 µl de DMEM. Entonces se añadieron 100 µl de cada una de la dilución resultante (1 en 10 y 1 en 100) a los pocillos de la placa que contenía células HEK 293.

20 Adicionalmente, otra muestra de adenovirus, de la misma fuente y con el mismo título (en almacenamiento a -80 °C) usada en los tratamientos de excipiente, se descongeló y se usó para producir una serie de dilución 1 en 10 (en DMEM + 10 % de FBS). También se añadieron diluciones que oscilaban de 1 en 10 a 1 en  $10^6$  a pocillos individuales que contenían HEK 293. 48 horas después de la inoculación, se contó el número de células de GFP (proteína verde fluorescente) por pocillo usando microscopía fluorescente, y esto se convirtió posteriormente en ufp/ml de las muestras tratadas teniendo en cuenta el volumen aplicado y la dilución del inóculo.

25

#### *Resultados*

30 Los resultados se muestran en la Figura 2. Cuando los datos se analizaron por análisis de regresión lineal múltiple (MLR) usando el programa MODDE 9.0 (Umetrics, Suecia), se observó un efecto sinérgico cuando MSM y DMG se usaron en combinación

### **Ejemplo 3: Estabilización de MVA**

#### *Preparación de preparaciones de virus líquidas*

35

Se recuperó MVA de almacenamiento a -80 °C y se descongeló. Se añadieron alícuotas de 50 µl a viales de vidrio de 5 ml. A estos viales se añadieron 250 µl de una mezcla de formulación enumerada en la Tabla 1 anterior. Los viales se taparon con tapón y se ajustaron tapas roscadas para el sellado. Los viales se colocaron inmediatamente a 37 °C para exposición térmica. La exposición térmica fue durante 7 días, después de lo cual todos los viales se devolvieron a 4 °C hasta que fue práctico ensayarlos.

40

#### *Ensayo para MVA infeccioso*

45 Se sembraron placas de ensayo (96 pocillos) con células BHK-21 (100 µl por pocillo,  $10^5$  células/ml). Las células se diluyeron en DMEM complementado con 10 % de FBS y 1 % de PS. Las placas se colocaron a +37 °C, + 5 % de CO<sub>2</sub> durante 1 a 2 horas.

45

Mientras tanto, se preparó una serie de dilución de muestras de MVA formuladas (en el mismo medio de crecimiento) que oscilaba de  $10^{-1}$  a  $10^{-4}$ . Cada serie de dilución se preparó 4 veces. Se aplicaron 35 µl de cada dilución a pocillos individuales que contenían células BHK-21 y los pocillos se rellenaron con otros 65 µl de medio.

50

En el día 6 después de la inoculación, los pocillos se puntuaron para la presencia o ausencia de efecto citopático (CPE) y se calculó TCID<sub>50</sub>. Entonces se usaron éstas para estimar la concentración de MVA infeccioso por ml en los viales termo-expuestos.

5 **Resultados**

Los resultados se muestran en la Figura 3.

10 **Ejemplo 4**

**Materiales**

*Productos químicos*

	<b>Proveedor</b>	<b>Código de producto</b>	<b>Lote N.º</b>
20x SSC	Sigma	S6639	020M8404
Medio Eagle modificado por Dulbecco	Sigma	D5796	RNBB1139
Suero bovino fetal	Sigma	F7524	109K3395
Penicilina-estreptomicina	Sigma	P4458	0409M0093
Trimetilglicina	Sigma	B2629	069K1514
Agua	Sigma	W3500	8M0411

15

*Productos biológicos*

	<b>Proveedor</b>	<b>Código de producto</b>
Línea celular BHK-21	ECACC	CB2857
MVA	ATCC	VR-1508

*Otros*

	<b>Fabricante</b>	<b>Código de producto</b>
Viales de vidrio de 5 ml	Adelphi Tubes	VCD005
Tapones de liofilización de 14 mm	Adelphi Tubes	FDIA14WG/B
Tapas de 14 mm	Adelphi Tubes	CWPP14

**Equipo**

	<b>Fabricante</b>	<b>Equipo N.º</b>
Vitrina de clase de seguridad II HERA	Thermo Fisher	EQP# 011 y 012
Microscopio invertido LED DMIL	Leica	EQP#062
Estufa de incubación de CO <sub>2</sub> Binder	Binder	EQP#014
Congelador a -80 °C serie Forma 900	Thermo Fisher	EQP#015
Balanza ATL-84-1 Atlion	Acculab	EQP#088
Estufa de incubación a 37 °C IP250	LTE	EQP#016

20

**Métodos**

Diseño del experimento

25 Se usó MODDE 9.0 para generar un diseño central compuesto centrado en las caras (CCF) (véase la Figura 4). Los diseños de CCF son una forma de diseño del modelado de superficie de respuesta (RSM) que prueba solo tres niveles de cada factor, pero todavía soporta un modelo cuadrático. A diferencia de los diseños de formulación regulares, pueden eliminarse factores no significativos del análisis y así no llegan a ser un factor de confusión.

30 *Preparación de y exposición térmica de MVA formulado en un entorno líquido*

Se recuperó MVA del almacenamiento a -80 °C y se descongeló. Se añadieron alícuotas de 50 µl de MVA a 15 viales de vidrio de 5 ml. Posteriormente, se añadieron alícuotas de 50 µl de virus a 15 viales de vidrio de 5 ml. A cada vial se mezclaron 250 µl de una mezcla de excipiente. Las formulaciones de mezcla de excipiente una vez mezcladas con virus se describen en la Tabla 3 y se enrasaron en SSC.

35

**Tabla 3**

<b>Formulación N.º</b>	<b>Sacarosa</b>	<b>Rafinosa</b>	<b>TMG</b>	<b>Título (ufp/ml)</b>
	<b>(M)</b>	<b>(mM)</b>	<b>(M)</b>	
1	0,25	150,0	0,13	7,6E+04
2	0,75	150,0	0,13	3,0E+05
3	0,5	272,5	0,42	3,0E+05
4	0,25	27,5	0,71	3,0E+05

Formulación N.º	Sacarosa	Rafinosa	TMG	Título (ufp/ml)
	(M)	(mM)	(M)	
5	0,75	27,5	0,71	4,8E+05
6	0	150,0	1,00	1,9E+05
7	0,5	150,0	1,00	4,8E+05
8	0,5	150,0	1,00	4,8E+05
9	0,5	150,0	1,00	3,0E+05
10	1	150,0	1,00	3,0E+05
11	0,25	272,5	1,29	4,8E+05
12	0,75	272,5	1,29	7,6E+05
13	0,5	27,5	1,58	3,0E+05
14	0,25	150,0	1,87	4,8E+05
15	0,75	150,0	1,87	4,8E+05

Los viales se taparon con tapón y con tapa (tapa roscada) antes de colocarse a +37 °C durante 1 semana de termo-exposición y después se colocaron a +4 °C hasta que fue práctico ensayarlos.

#### 5 Ensayo de MVA

Se sembraron placas de ensayo (96 pocillos) con células BHK-21 (100 µl por pocillo, 10<sup>5</sup> células/ml). Las células se diluyeron en DMEM complementado con 10 % de FBS, y 1 % de PS. Las placas se colocaron a +37 °C, + 5 % de CO<sub>2</sub> durante 1-2 horas.

10 Se preparó una serie de dilución de 10 veces de muestras de MVA formuladas (en el mismo medio de crecimiento) que oscilaban de 1 en 10 a 1 en 10.000. Cada serie de dilución se preparó 5 veces. Se aplicaron 100 µl de cada dilución a pocillos individuales que contenían células BHK-21 (descrito anteriormente).

15 6 d p.i., los pocillos se puntuaron para la presencia o ausencia de CPE y se calculó TCID<sub>50</sub>. Entonces se usaron éstas para estimar la concentración de MVA infeccioso por ml en los viales termo-expuestos.

Posteriormente, se preparó una serie de dilución doble de muestras de MVA formuladas que oscilaba de 1 en 2.000 a 1 en 32.000. Estas diluciones se ensayaron por separado pero como antes.

#### 20 Resultados

Los datos sin procesar recogidos en esta investigación se muestran en la Tabla 3 anterior. Las respuestas oscilaron de 7,6x10<sup>4</sup> a 7,6x10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub>/ml, o 7,4-74,0 % de título inicial (véase la Tabla 3). El modelo generado a partir de estos datos se puntuó razonablemente en los cuatro parámetros de evaluación del modelo (R<sup>2</sup> = 0,79, Q<sup>2</sup>=0,49, Modelo validez =0,90, Reproducibilidad=0,59) (véase la Figura 5).

30 Se predijo que todos de sacarosa, TMG y rafinosa tenían efectos positivos de 1º orden sobre la recuperación viral sobre el intervalo de concentración probado. Aunque el efecto de la rafinosa fue solo significativo al 90 % de IC, se retuvo en el modelo, ya que mejoró la solidez del modelo y se requirió para preservar la jerarquía del modelo. Esto se requirió debido a que también se predijo una interacción de TMG y rafinosa. Finalmente, se observó un efecto no lineal de 2º orden de la sacarosa. Véase la Figura 6 para un resumen de coeficientes retenidos en el modelo.

35 La Figura 7 es de un gráfico de contornos 4D que ilustra las interacciones claramente. La concentración óptima de sacarosa puede observarse que está consistentemente entre 0,6 y 0,8 M, ningún otro excipiente altera significativamente esto. En general, cuanto mayor sea la concentración de TMG, mayor será la recuperación de actividad viral.

40 Simulaciones de Monte-Carlo (mostradas en la Figura 8) indican al extremo del intervalo probado para un óptimo (sacarosa 1 M, TMG 1 M, rafinosa 300 mM). Esto sugiere que la formulación óptima no está cubierta por el intervalo probado. Sin embargo, las simulaciones predicen que las formulaciones próximas a este óptimo deben dar la actividad viral recuperada del 94 % de título inicial.

#### 45 Ejemplo 5

##### Materiales

*Productos químicos*

	<b>Proveedor</b>	<b>Código de producto</b>	<b>Lote N.º</b>
24x SSC	Sigma	S6639	020M8404
Dimetilglicina	Sigma	D1156	077K1856
Medio Eagle modificado por Dulbecco	Sigma	D5796	RNBB1139
Suero bovino fetal	Sigma	F7524	109K3395
Penicilina-estreptomocina	Sigma	P4458	0409M0093
Rafinosa	Sigma	R0250	050M0053
Sacarosa	Sigma	16104	SZB90120
Agua	Sigma	W3500	8M0411

*Productos biológicos*

	<b>Proveedor</b>	<b>Código de producto</b>
Adenovirus	Vector Biolabs	Ad-CMV-GFP
HEK 293	ECACC	<u>85120602</u>

5

*Otros*

	<b>Fabricante</b>	<b>Código de producto</b>
Viales de vidrio de 5 ml	Adelphi Tubes	VCD005
Tapones de liofilización de 14 mm	Adelphi Tubes	FDIA14WG/B
Tapas de 14 mm	Adelphi Tubes	CWPP14

*Equipo*

	<b>Fabricante</b>	<b>Equipo N.º</b>
Vitrina de clase de seguridad II HERA	Thermo Fisher	EQP# 011 y 012
Microscopio invertido LED DMIL	Leica	EQP#062
Estufa de incubación de CO <sub>2</sub> Binder	Binder	EQP#014
Congelador a -80 °C serie Forma 900	Thermo Fisher	EQP#015
Balanza ATL-84-1 Atlion	Acculab	EQP#088
Estufa de incubación a 37 °C IP250	LTE	EQP#016

**Métodos**

10 *Diseño del experimento*

Se usó MODDE 9.0 (Umetrics) para generar un diseño experimental de Doehlert (véase la Figura 9). Los diseños de Doehlert son diseños de modelado de superficie de respuesta contruidos a partir de simplex regulares. Son fácilmente extensibles en diferentes direcciones y pueden añadirse factores nuevos a un diseño existente. A diferencia de los diseños de formulación regulares, pueden eliminarse factores no significativos del análisis y así no llegan a ser un factor de confusión.

15

Además, se prueban diferentes factores dentro del diseño a un número de niveles diferente, así es posible asignar más niveles de prueba a factores que los presentes inventores sospechan que son de mayor importancia. Así, se probó DMG a siete niveles, mientras se probó sacarosa a cinco y rafinosa a tres. Este modelo retiene la capacidad para modelar efectos de segundo orden e interacciones. El diseño incluyó tres factores y tres puntos centrales duplicados que produjeron quince muestras de prueba.

20

La sacarosa se probó entre 0 y 1 M. la rafinosa se probó sobre un intervalo de 0 a 300 mM, aunque la naturaleza del diseño de Doehlert significó que los niveles probados no incluyeron 0 mM. En su lugar, se probaron los siguientes intervalos: 27,5, 150,0 y 272,5 mM. DMG se probó sobre un intervalo lineal de 0 a 2 M.

25

*Estabilidad de adenovirus en un entorno líquido*

Se sacó adenovirus recombinante que expresa GFP potenciada bajo un promotor del CMV, con un título (pre-congelación) de  $6,7 \times 10^5$  ufp/ml en SSC, de almacenamiento a -80 °C y se dejó que se descongelara. Posteriormente, se añadieron alícuotas de 50 µl de virus a 15 viales de vidrio de 5 ml. A cada vial se mezclaron 250 µl de una mezcla de excipiente. Las formulaciones de mezcla de excipiente una vez mezcladas con virus se describen en la Tabla 4 y se enrasaron en SSC.

30

35

**Tabla 4**

<b>Formulación N.º</b>	<b>Sacarosa (M)</b>	<b>Rafinosa (mM)</b>	<b>DMG (M)</b>	<b>Título (ufp/ml)</b>
1	0,25	150,0	0,13	1,1E+05
2	0,75	150,0	0,13	2,2E+05
3	0,5	272,5	0,42	3,8E+05

Formulación N.º	Sacarosa (M)	Rafinosa (mM)	DMG (M)	Título (ufp/ml)
4	0,25	27,5	0,71	2,0E+05
5	0,75	27,5	0,71	2,6E+05
6	0	150,0	1,00	2,2E+05
7	0,5	150,0	1,00	2,2E+05*
8	0,5	150,0	1,00	3,1E+05
9	0,5	150,0	1,00	3,4E+05
10	1	150,0	1,00	4,1E+05
11	0,25	272,5	1,29	2,5E+05
12	0,75	272,5	1,29	3,7E+05
13	0,5	27,5	1,58	3,7E+05
14	0,25	150,0	1,87	2,5E+05
15	0,75	150,0	1,87	3,3E+05
* indica un valor atípico eliminado del modelo				

Los viales se taparon con tapón y con tapa (tapa roscada) antes de colocarse a +37 °C durante 1 semana de termo-exposición y después se colocaron a +4 °C hasta que fue práctico ensayarlos. El ensayo de adenovirus fue como se describe a continuación.

5

#### Ensayo de adenovirus

Se prepararon células HEK 293 en placas de cultivo celular de fondo plano de 96 pocillos para inoculación por siembra a  $10^5$  células por ml (100  $\mu$ l por pocillo) y se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de 2 horas se inocularon las células del siguiente modo.

10

Se diluyeron muestras de virus termo-expuestas 1 en 10 y 1 en 100 en DMEM +10 % de FBS +1 % de PS. Entonces se añadieron 100  $\mu$ l de cada una de las muestras de virus diluidas resultantes a pocillos individuales de la placa de ensayo. Adicionalmente, se descongeló una segunda alícuota del adenovirus original en SSC de -80 °C y también se preparó una serie de dilución de 10 veces (de 1 en 10 a 1 en 100.000) en DMEM +10 % de FBS +1 % de PS. La serie de dilución de control positivo se inoculó por duplicado a cada placa de 96 pocillos usada. Después de otras 48 horas, se contó el número de células de GFP por pocillo usando microscopía fluorescente.

15

#### Resultados

20

Se generó un modelo muy fuerte a partir de estos datos (véase la Tabla 4). El modelo se puntuó altamente con los cuatro indicadores ( $R^2=0,97$ ,  $Q^2=0,90$ , Validez del modelo=0,89, Reproducibilidad=0,96) (véase la Figura 10). El modelo se potenció durante el ajuste por la eliminación de un duplicado. Esta formulación fue marcada por el software como un valor atípico obvio.

25

Se mostró que los tres excipientes en la formulación eran factores significativos en el modelo (véase la Figura 11). La sacarosa y la rafinosa solo tuvieron efectos de 1º orden, mientras que DMG tuvo tanto efectos de 1º como de 2º orden. Además, hubo una interacción entre rafinosa y DMG.

La Figura 12 muestra que la concentración óptima de sacarosa está más allá de la probada. Sin embargo, es poco probable que la concentración de sacarosa aumente significativamente debido a las limitaciones en la osmolaridad del producto. A algunos niveles, DMG potencia el efecto protector de la formulación, y la rafinosa altera la concentración óptima de DMG para este fin.

30

Se usaron simulaciones de Monte-Carlo para predecir una formulación óptima (véase la Figura 13). El programa se estableció para maximizar la actividad viral recuperada a un límite de  $4,3 \times 10^5$  ufp/ml (el título de un control positivo). La formulación óptima predicha fue sacarosa 0,5 M, DMG 0,4 M, rafinosa 272 nM y se predijo que esto daba un título de  $3,6 \times 10^5$  ufp/ml o 84 % del título inicial (basado en el control positivo).

35

La Figura 14a muestra una forma alternativa de mirar los datos. Un gráfico de contornos muestra la concentración de DMG representada contra la concentración de sacarosa a varias concentraciones de rafinosa diferentes. El gráfico muestra que la región más oscura (mayor recuperación de la actividad de virus) mueve el eje y (concentración de DMG) a medida que aumenta la rafinosa. Una cruz negra marca la formulación óptima predicha. La Figura 14b muestra la región donde se predice que la recuperación es del 100 % o mayor.

40

45

**Ejemplo 6**

**Materiales**

5		<i>Productos químicos</i>		
		<b>Proveedor</b>	<b>Código de producto</b>	<b>Lote N.º</b>
	Dimetilglicina	Sigma	D1156	077K1856
	Medio Eagle modificado por Dulbecco	Sigma	D5796	RNBB1139
	Suero bovino fetal	Sigma	F7524	109K3395
	Rafinosa	Sigma	R0250	050M0053
	Sacarosa	Sigma	16104	SZB90120
	Agua	Sigma	W3500	8M0411

		<i>Productos biológicos</i>	
		<b>Proveedor</b>	<b>Código de producto</b>
	Adenovirus	Vector Biolabs	Ad-CMV-GFP
	HEK 293	ECACC	<u>85120602</u>

		<i>Otros</i>	
		<b>Proveedor</b>	<b>Código de producto</b>
	Viales de vidrio de 5 ml	Adelphi Tubes	VCD005
	taponos de liofilización de 14 mm	Adelphi Tubes	FDIA14WG/B
	Tapas de 14 mm	Adelphi Tubes	CWPP14

10

		<i>Equipo</i>	
		<b>Fabricante</b>	<b>Equipo N.º</b>
	Secadora		
	Vitrina de clase de seguridad II HERA	Thermo Fisher	EQP# 011 y 012
	Microscopio invertido LED DMIL	Leica	EQP#062
	Estufa de incubación de CO <sup>2</sup> Binder	Binder	EQP#014
	Congelador a -80 °C serie Forma 900	Thermofisher	EQP#015
	Balanza ATL-84-1 Atlion	Acculab	EQP#088
	Estufa de incubación a 37 °C IP250	LTE	EQP#016

**Métodos**

15 Se sacó adenovirus recombinante que expresa GFP potenciada bajo un promotor del CMV, con un título (después de la descongelación) de 10,2x10<sup>5</sup> ufp/ml en PBS, de almacenamiento a -80 °C y se dejó que se descongelara. Posteriormente, se añadieron alícuotas de 50 µl de virus a 15 viales de vidrio de 5 ml. A cada vial se mezclaron 250 µl de una mezcla de excipiente. Las formulaciones de mezcla de excipiente una vez mezcladas con virus se describen en la Tabla 5 y se enrasaron en PBS.

20

**Tabla 5**

Nombre de la formulación	Tampón	Rafinosa (mM)	Sacarosa (M)	DMG (M)
Tampón	PBS	0	0	0
Rafinosa	PBS	100	0	0
Sacarosa	PBS	0	1	0
Azúcares	PBS	100	1	0
NE	PBS	0	0	0,7
Mejor	PBS	100	1	0,7

Desde este punto en adelante se usan los siguientes nombres de tratamiento:

- "Tampón" = tampón PBS solo sin excipientes
- "Sacarosa" = sacarosa 1 M en PBS
- "Rafinosa" = rafinosa 100 mM en PBS
- "Azúcares" = sacarosa 1 M, rafinosa 100 mM en PBS,
- "NE" = DMG 0,7 M en PBS,
- "Mejor" = sacarosa 1 M, rafinosa 100 mM, DMG 0,7 M en PBS.

Los viales se taparon con tapón y con tapa (tapa roscada) antes de ser térmicamente expuestos en las condiciones expuestas en la Tabla 6. En momentos de tiempo apropiados, se llevó a cabo un ensayo de adenovirus como se describe en el Ejemplo 5.

25

**Resultados**

Muchos puntos de datos reunidos estuvieron por debajo del umbral de detección del ensayo (véase la Tabla 6).

Tabla 6

Exposición térmica		Formulación					
Temperatura	Duración	Mejor	Sacarosa	Rafinosa	Azúcares	NE	Tampón
+4 °C	6 meses	2,0E+06	1,8E+06	1,1E+06	1,7E+06	1,3E+06	1,0E+06
+254 °C	1 mes	5,2E+05	1,9E+05	1,6E+05	2,0E+05	2,3E+05	7,2E+04
	6 meses	1,9E+05	6,0E+02*	6,0E+02*	1,0E+05	3,0E+04	6,0E+02*
+37 °C	1	2,3E+04	3,0E+03	6,0E+02*	4,2E+03	6,0E+02*	6,0E+02*
	8	1,7E+04	6,0E+02*	6,0E+02*	6,0E+02*	6,0E+02*	6,0E+02*
	12	3,6E+03	6,0E+02*	6,0E+02*	6,0E+02*	6,0E+02*	6,0E+02*

\*punto de datos por debajo del umbral de detección

5 Por comodidad, a estos puntos de datos se les ha asignado el valor umbral ya que éste es el máximo valor posible que podrían tener. Es probable que esto tenga poco efecto sobre la interpretación de los resultados, ya que cualquier formulación que dé tal baja recuperación de viral actividad es de poco uso práctico como algo distinto de un comparador. El umbral de detección para este ensayo es 600 ufp/ml, que es igual al 0,03 % de la actividad recuperada.

10 Solo se probó un momento de tiempo para las muestras mantenidas a +4 °C. El rendimiento de la actividad de virus después de 6 meses a esta temperatura puede observarse en la Figura 15. El tratamiento de solo tampón dio recuperación del 50,1 % del título inicial y una clara indicación de que el adenovirus usado es inherentemente razonablemente estable en este entorno líquido. Este hallazgo también muestra la necesidad de estudios de estabilidad acelerada.

15 El tratamiento con "sacarosa" recuperó el 92,1 % de la actividad, que después de 6 meses es una mejora importante en el tampón solo. "Rafinosa", a diferencia, solo dio el 55,5 %, una ligera mejora en "Tampón solo" pero peor que "Sacarosa". El tratamiento con "Azúcares" combinados dio una actividad de virus recuperado de solo el 86,4 %.

20 El tratamiento de solo DMG ("NE") preservó solo el 65,1 % de la actividad de virus, pero cuando se usó junto con los azúcares se observó una actividad recuperada del 99,3 %. Este hallazgo es pérdida próxima a cero de adenovirus a +4 °C después de 6 meses.

25 La actividad viral recuperada en esta formulación "Mejor" en cada momento de tiempo y la exposición a temperatura se muestra en la Figura 16. Como se trató previamente después de 6 meses a +4 °C, hay una pérdida próxima a cero.

Los resultados (véanse la Tabla 6 y la Figura 17) a termo-exposiciones a +25 °C y +37 °C demuestran que la formulación "Mejor" es más eficaz en estabilizar el adenovirus que sus componentes constituyentes.

### 30 **Ejemplo 7**

#### **Materiales**

##### *Productos químicos*

	<b>Proveedor</b>	<b>Código de producto</b>	<b>Lote N.º</b>
20x SSC	Sigma	S6639	020M8404
Dimetilglicina	Sigma	D1156	077K1856
Medio Eagle modificado por Dulbecco	Sigma	D5796	RNBB1139
Suero bovino fetal	Sigma	F7524	109K3395
Penicilina-estreptomicina	Sigma	P4458	0409M0093
Agua	Sigma	W3500	8M0411

35

##### *Productos biológicos*

	<b>Proveedor</b>	<b>Código de producto</b>
BHK-21 línea celular	ECACC	CB2857
MVA	ATCC	VR-1508

##### *Otros*

	<b>Fabricante</b>	<b>Código de producto</b>
Viales de vidrio de 2 ml	Adelphi Tubes	VCDIN2R
Tapones de liofilización de 13 mm	Adelphi Tubes	FDW13
Plegados	Adelphi Tubes	COTW13

40



	<b>Equipo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Equipo N.º</b>
	Vitrina de clase de seguridad II HERA	Thermo Fisher	EQP# 011 y 012
	Microscopio invertido LED DMIL	Leica	EQP#062
	Estufa de incubación de CO2 Binder	Binder	EQP#014
	Congelador a -80 °C serie Forma 900	Thermofisher	EQP#015
	Balanza ATL-84-1 Atlion	Acculab	EQP#088
	Estufa de incubación a 37 °C IP250	LTE	EQP#016

## Métodos

### 5 *Diseño del experimento*

Se usó MODDE 9.0 para generar un diseño compuesto central centrado en las caras (CCF). Los diseños de CCF son una forma de diseño del modelado de superficie de respuesta (RSM) que prueba solo 3 niveles de cada factor, pero todavía soporta un modelo cuadrático (véase la Figura 18). A diferencia de los diseños de formulación regulares, pueden eliminarse factores no significativos del análisis y así no llegan a ser un factor de confusión.

### *Preparación de y exposición térmica de MVA formulado en un entorno líquido*

Se recuperó MVA del almacenamiento a -80 °C y se descongeló. Posteriormente, se añadieron alícuotas de 50 µl de virus a 15 viales de vidrio de 5 ml. A cada vial se mezclaron 250 µl de una mezcla de excipiente. Las formulaciones de mezcla de excipiente una vez mezcladas con virus se describen en la Tabla 7 más adelante y se enrasaron en SSC. Los viales se taparon con tapón a vacío, y se taparon (tapa roscada) antes de colocarse a +37 °C durante 1 semana de termo-exposición y después se colocaron a +4 °C hasta que fue práctico ensayarlos.

### 20 *Ensayo de MVA*

Se sembraron placas de ensayo (96 pocillos) con células BHK-21 (100 µl por pocillo, 10<sup>5</sup> células/ml). Las células se diluyeron en DMEM complementado con 10 % de FBS, y 1 % de PS. Las placas se colocaron a +37 °C, + 5 % de CO<sub>2</sub> durante 1-2 horas.

Mientras tanto, se preparó una serie de dilución de 10 veces de muestras de MVA formuladas (en el mismo medio de crecimiento) que oscilaba de 1 en 10 a 1 en 10.000. Cada serie de dilución se preparó como 5 duplicados. Se aplicaron 100 µl de cada dilución a pocillos individuales que contenían células BHK-21 (descrito anteriormente).

30 6 d p.i., los pocillos se puntuaron para la presencia o ausencia de CPE y se calculó TCID<sub>50</sub>. Entonces se usaron éstas para estimar la concentración de MVA infeccioso por ml en los viales termo-expuestos.

## Resultados

35 Los datos de TCID<sub>50</sub> sin procesar de este estudio se muestran en la Tabla 7.

**Tabla 7**

I.D. de muestra	DMG (M)	Manitol (mM)	Título (TCID <sub>50</sub> /ml)
1	0	6	1,90E+5
2	2	6	4,80E+3
3	0	600	3,00E+4
4	2	600	4,80E+5
5	0	303	3,00E+5*
6	2	303	3,00E+5
7	1	6	3,00E+4
8	1	600	3,00E+5
9	1	303	7,60E+5*
10	1	303	1,90E+5
11	i	303	1,90E+5

\* Punto de datos excluido del modelo durante el ajuste como un valor atípico obvio

40 Las respuestas variaron del 0,5 al 74,1 % del título inicial. El modelo predice los efectos de 1º orden de ambos excipientes (véase la Figura 19 y 20). En el caso de tanto DMG como manitol, la preservación viral aumenta a medida que aumenta la concentración. Esto se ilustra claramente por el gráfico de contornos mostrado en la Figura

21. Adicionalmente, se identificó una interacción entre DMG y manitol.

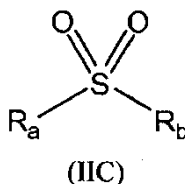
5 Simulaciones de Monte-Carlo sugieren que con la alta concentración de cada excipiente probada puede esperarse lograr más del 66 % del título inicial después de la exposición térmica a +37 °C durante 1 semana, esto representa menos de una pérdida de 0,2 LOG.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para la preparación de una solución acuosa, estable durante el almacenamiento, lista para su uso, que se proporciona en un envase sellado y que contiene partículas virales vivas, procedimiento que comprende:

(a) proporcionar una solución que comprende:

- agua o solución salina fisiológica, que está opcionalmente tamponada con un tampón fisiológicamente aceptable;
- partículas virales vivas de *Adenoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Poxviridae*, *Flaviviridae* o *Herpesviridae*;
- un excipiente que es una N,N-di(alquil C<sub>1-6</sub>)-glicina o N,N,N-tri(alquil C<sub>1-6</sub>)-glicina, o una sal o un éster fisiológicamente aceptable de las mismas;
- opcionalmente uno o más azúcares; y
- opcionalmente un compuesto de sulfona de fórmula (IIC):



en la que R<sub>a</sub> y R<sub>b</sub> representan independientemente alquilo C<sub>1-6</sub>; y

(b) sellar la solución en un recipiente.

2. El procedimiento según la reivindicación 1, en el que las partículas virales son de un adenovirus, virus de la variolovacuna, virus de la gripe o virus del sarampión.

3. El procedimiento según la reivindicación 1 o 2, en el que el excipiente es N,N-dimetilglicina o N,N,N-trimetilglicina, o una sal o un éster fisiológicamente aceptable de las mismas.

4. El procedimiento según la reivindicación 3, en el que el excipiente es N,N-dimetilglicina o una sal o un éster fisiológicamente aceptable de la misma.

5. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el uno o más azúcares comprenden sacarosa o manitol.

6. El procedimiento según la reivindicación 5, en que el uno o más azúcares comprenden sacarosa y rafinosa.

7. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el compuesto de sulfona de fórmula (IIC) es metilsulfonilmetano.

8. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la solución comprende además:

- (a) un adyuvante;
- (b) un agente de ajuste de la tonicidad; y/o
- (c) un conservante.

9. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la solución es isotónica.

10. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la solución se proporciona en un envase sellado bajo nitrógeno.

11. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el recipiente sellado es un vial, una ampolla, una jeringa, un cartucho, una bolsa flexible o una botella de vidrio, sellado.

12. El procedimiento según una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la solución se pasa a través de un filtro esterilizante en la etapa (a).

13. Una solución acuosa estable durante el almacenamiento, lista para su uso, que contiene partículas virales vivas de *Adenoviridae*, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Parvoviridae*, *Picornaviridae*, *Poxviridae*, *Flaviviridae* o *Herpesviridae* que se proporciona en un envase sellado, conteniendo dicha partícula viral viva solución acuosa que

es obtenible por un procedimiento como se define en una cualquiera de las reivindicaciones precedentes.

Figura 1a

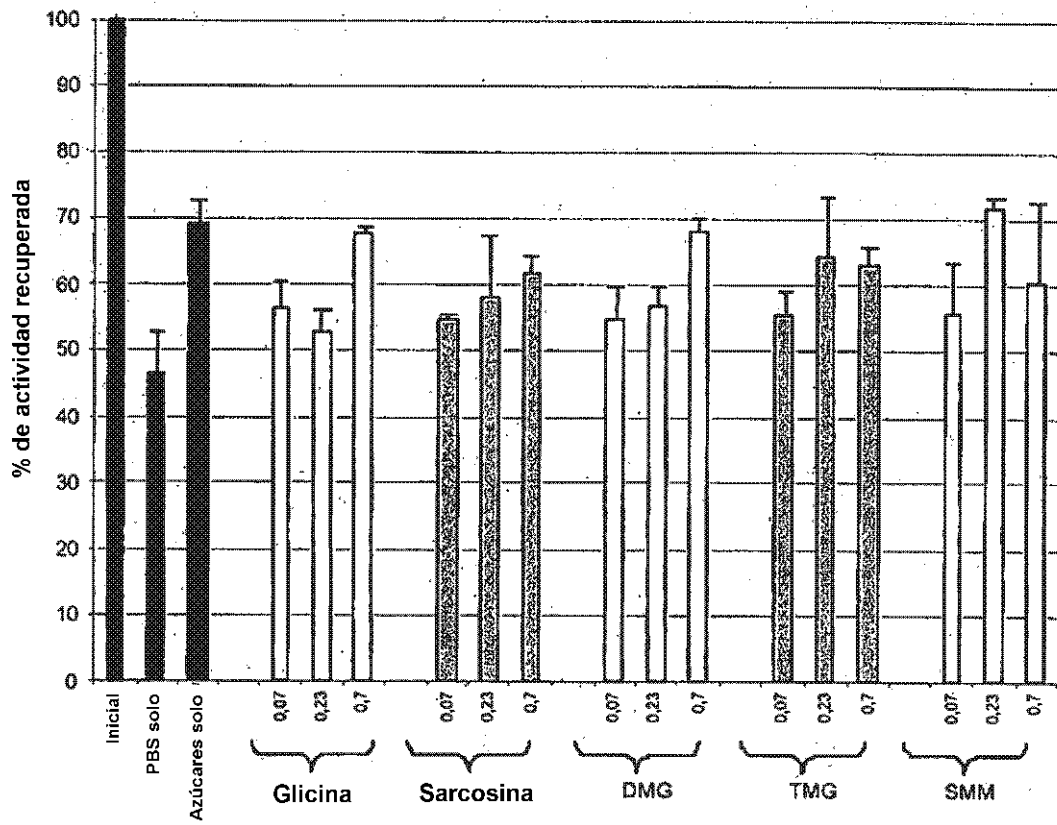


Figura 1b

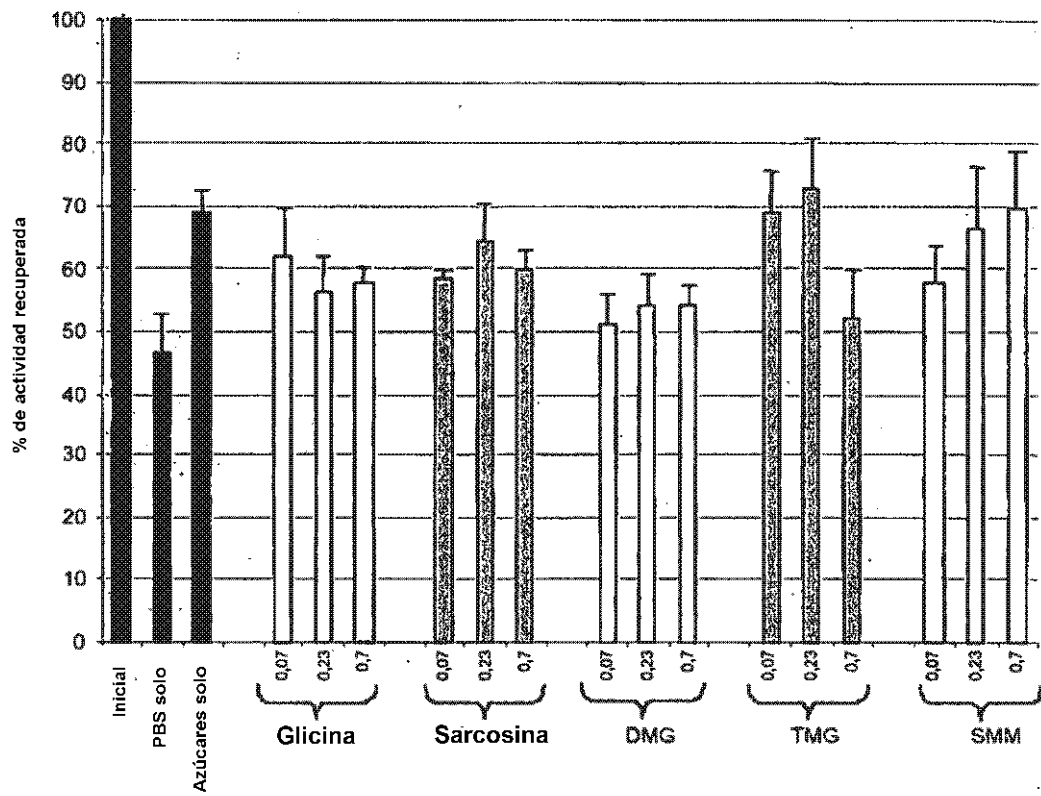


Figura 1c

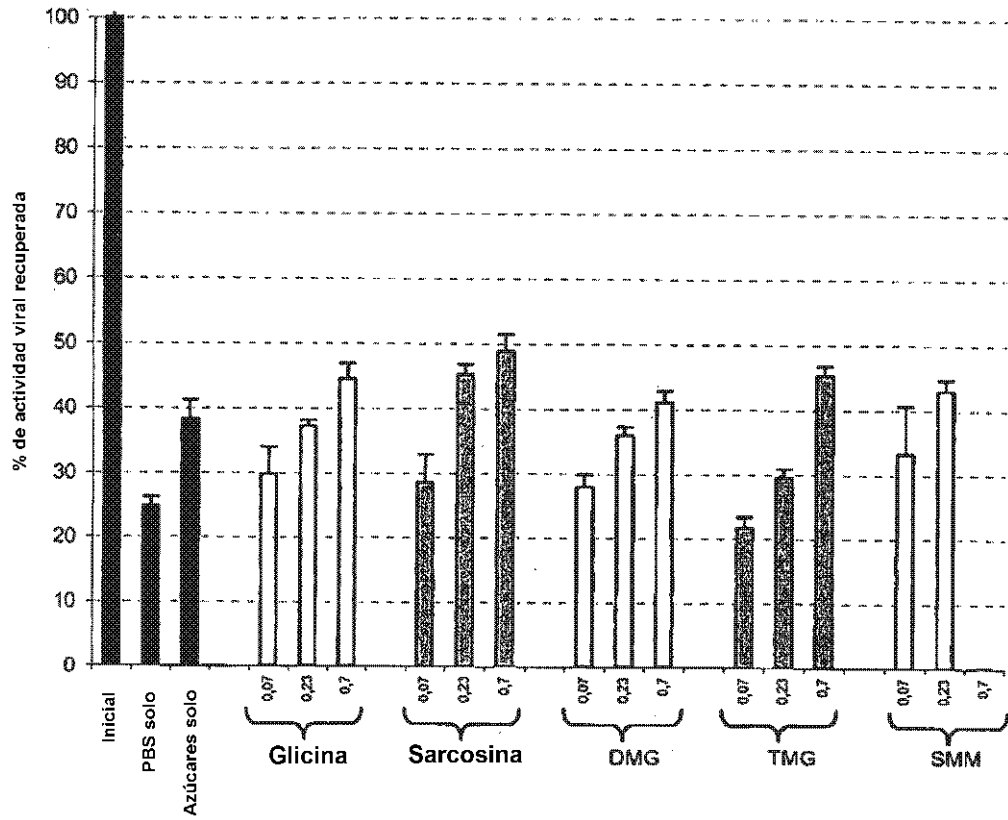


Figura 1d

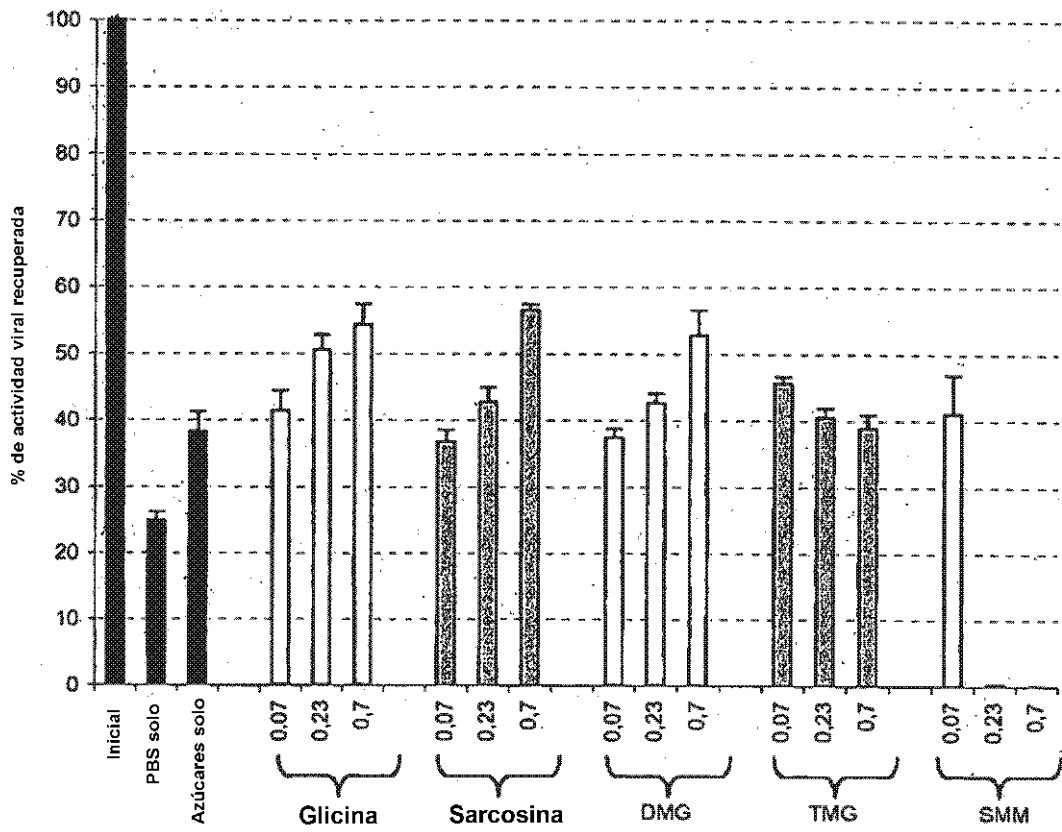




Figura 2

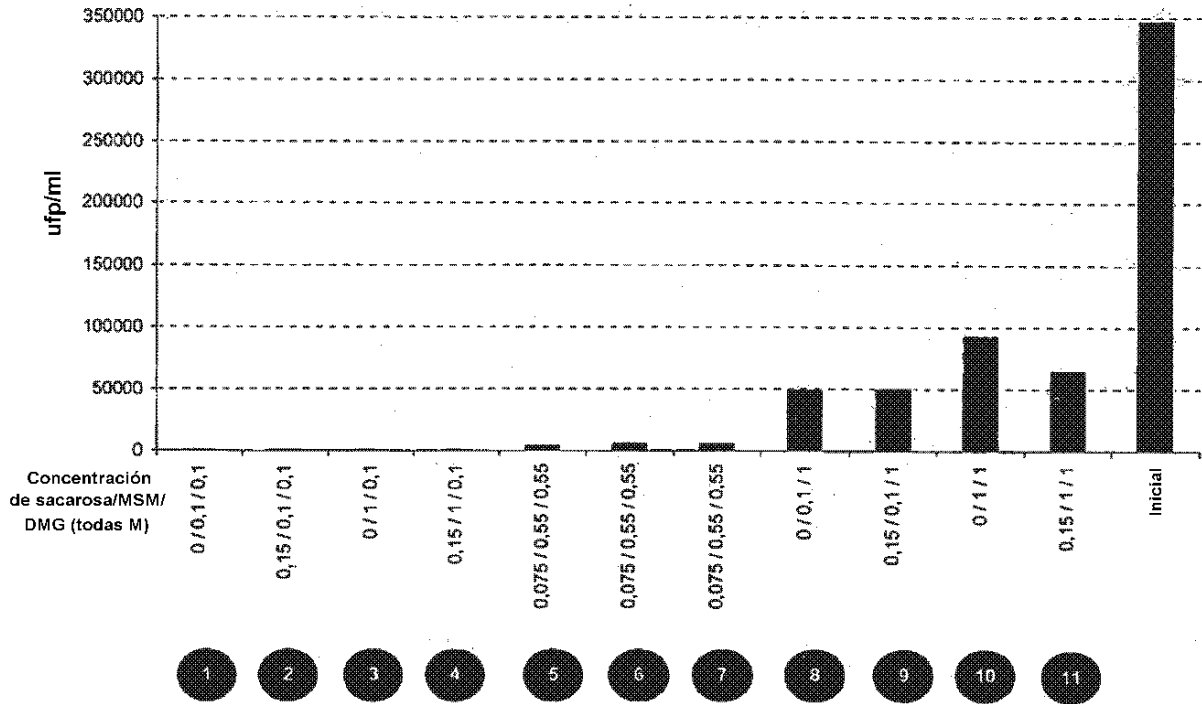


Figura 3

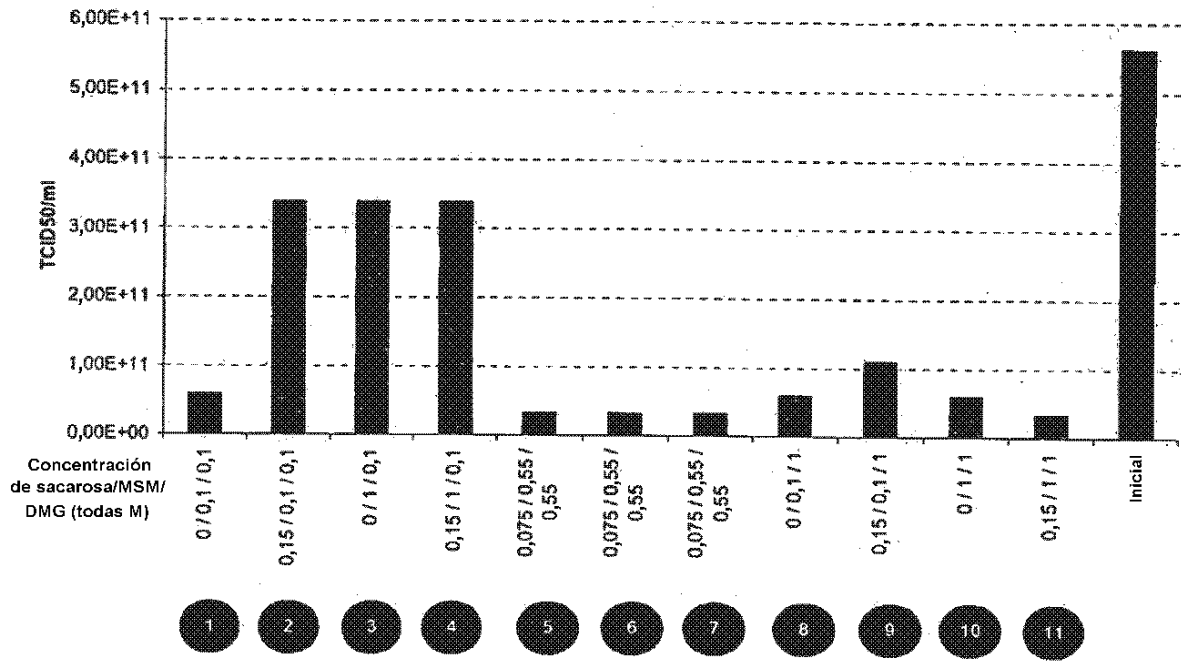


Figura 4

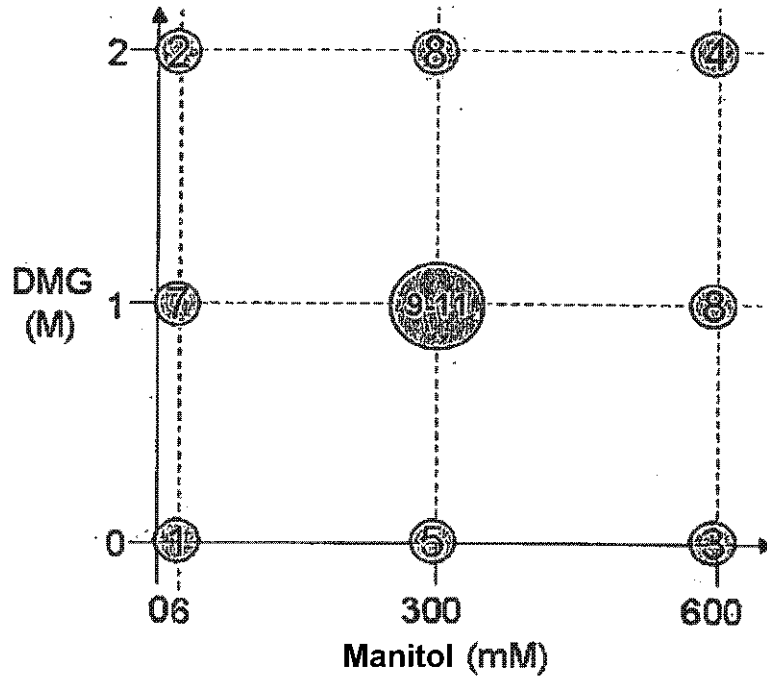


Figura 5

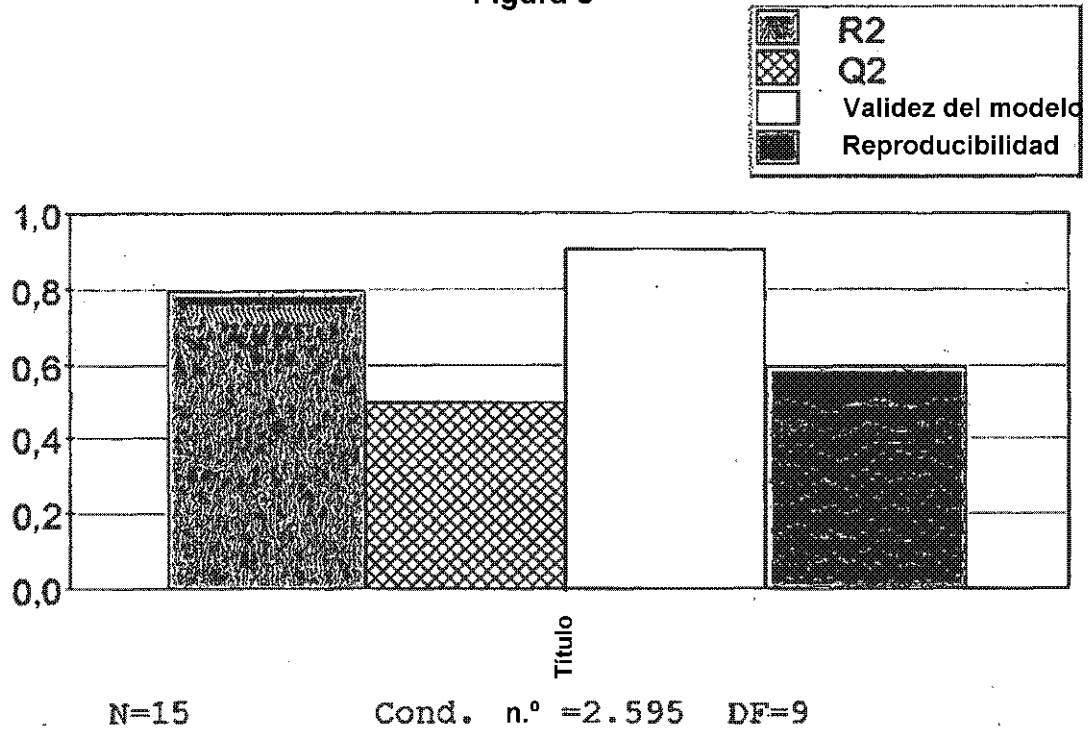
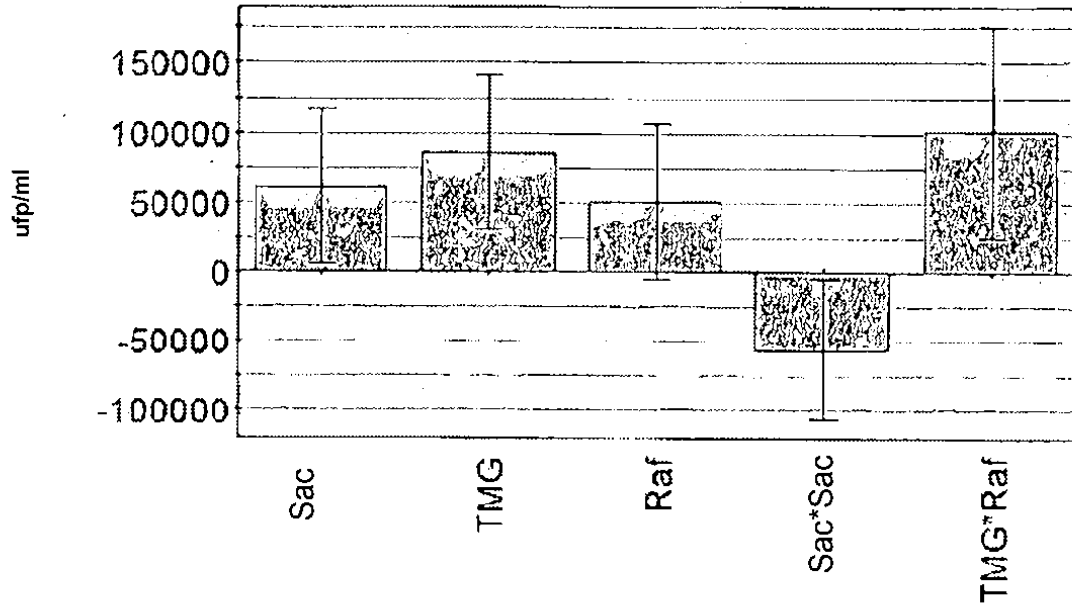


Figura 6



N=15  
DF=9

R2=0,794  
Q2=0,494

RSD=9,226e+004  
Nivel de conf. =0,95

Figura 7

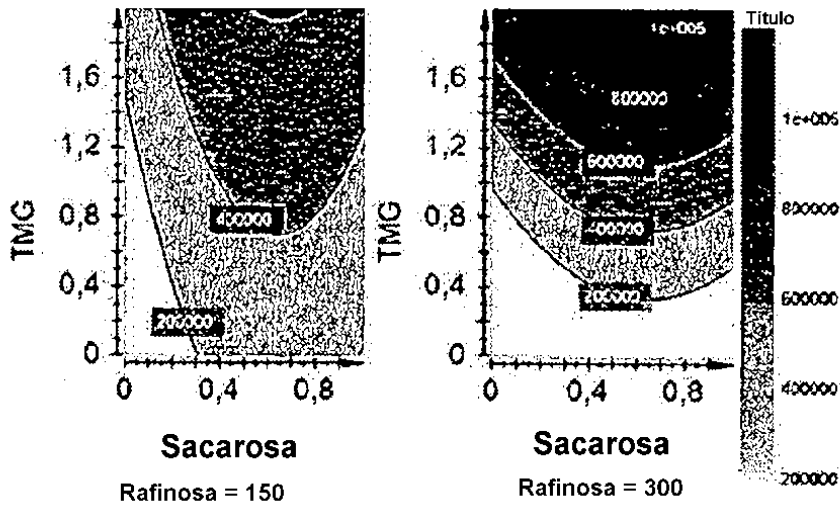


Figura 8

Factor	Role	Value	Low Limit	High Limit	Sen	Response	Criterion	Weight	Min	Target	Max
1	Titre	Free	0	1		Titre	Maximize	1	620375	672683	
2	DMG	Free	0	2							
3	Raffinose	Free	0	300							

Iteration	1	2	3	4	5	6	7
	Sucrose	DMG	Raffinose	Titre	Iter	log(D)	DPMO
1	0.6456	0	0.0002	546068	172	0.57678	
2	0	0	0.0014	220521	198	0.5295	
3	0	0.0156	0.0006	217513	193	0.5292	
4			300	256538	190	0.52860	22860
5	0.5806	1.9951	298.591	1.04529e+006	172	0.5100	0.100
6	0.25	1.6887	272.474	712020	176	0.5100	0.9900

Figura 9

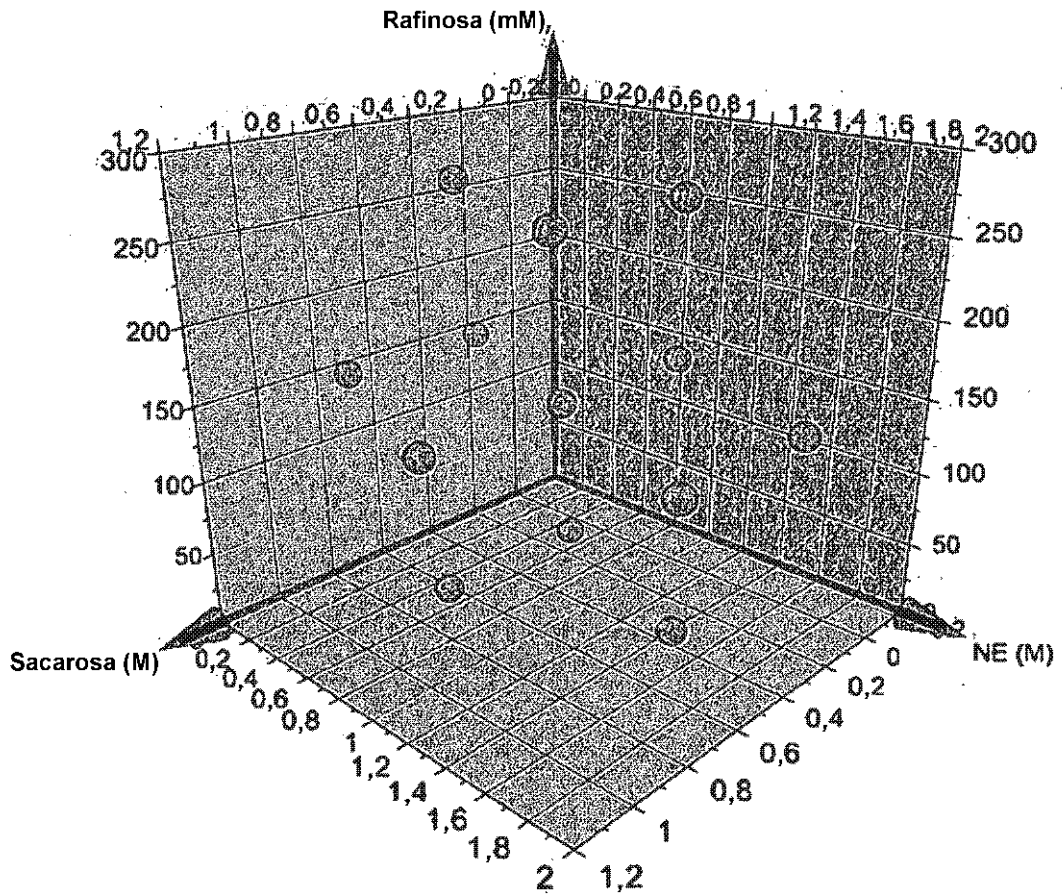


Figura 10

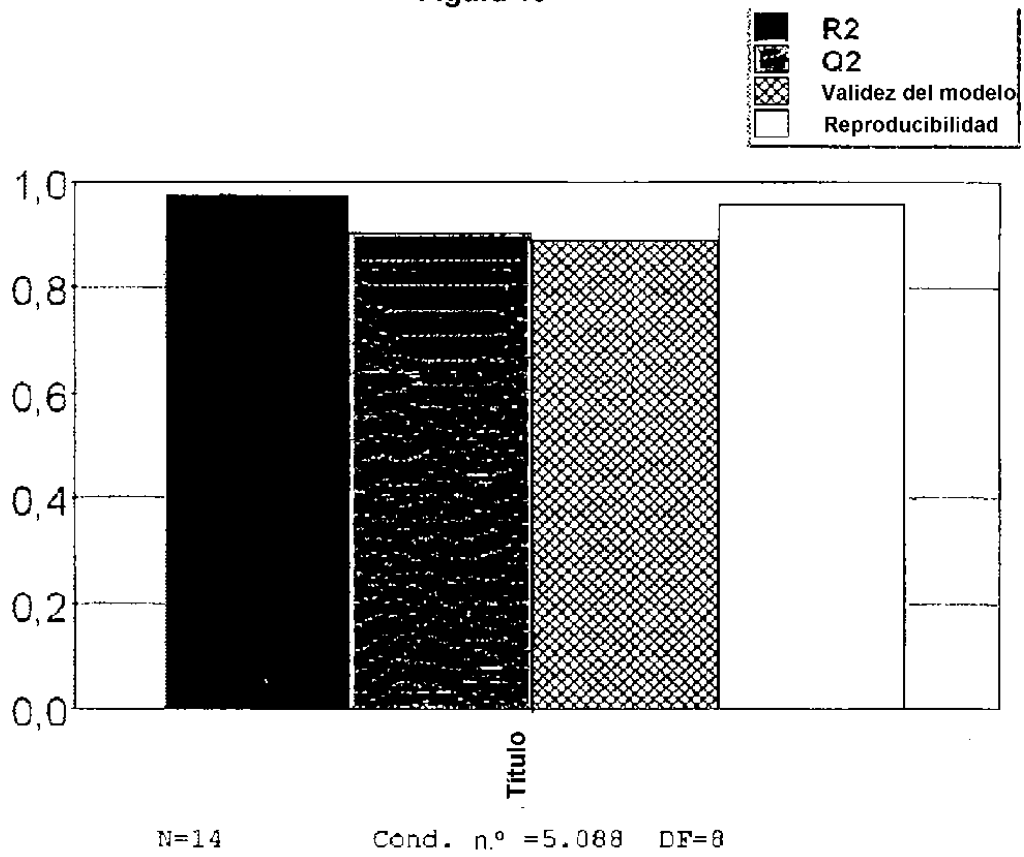


Figura 11

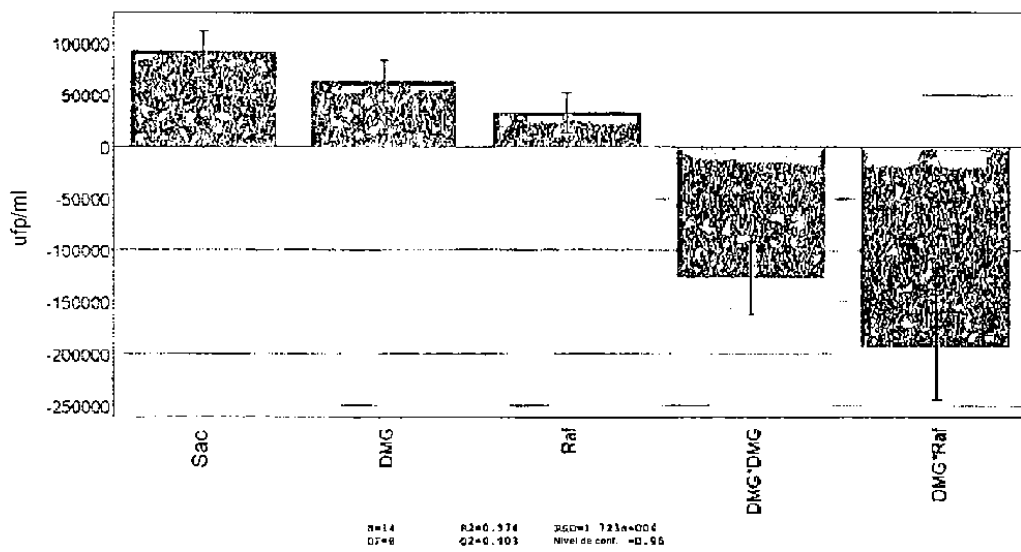




Figura 12

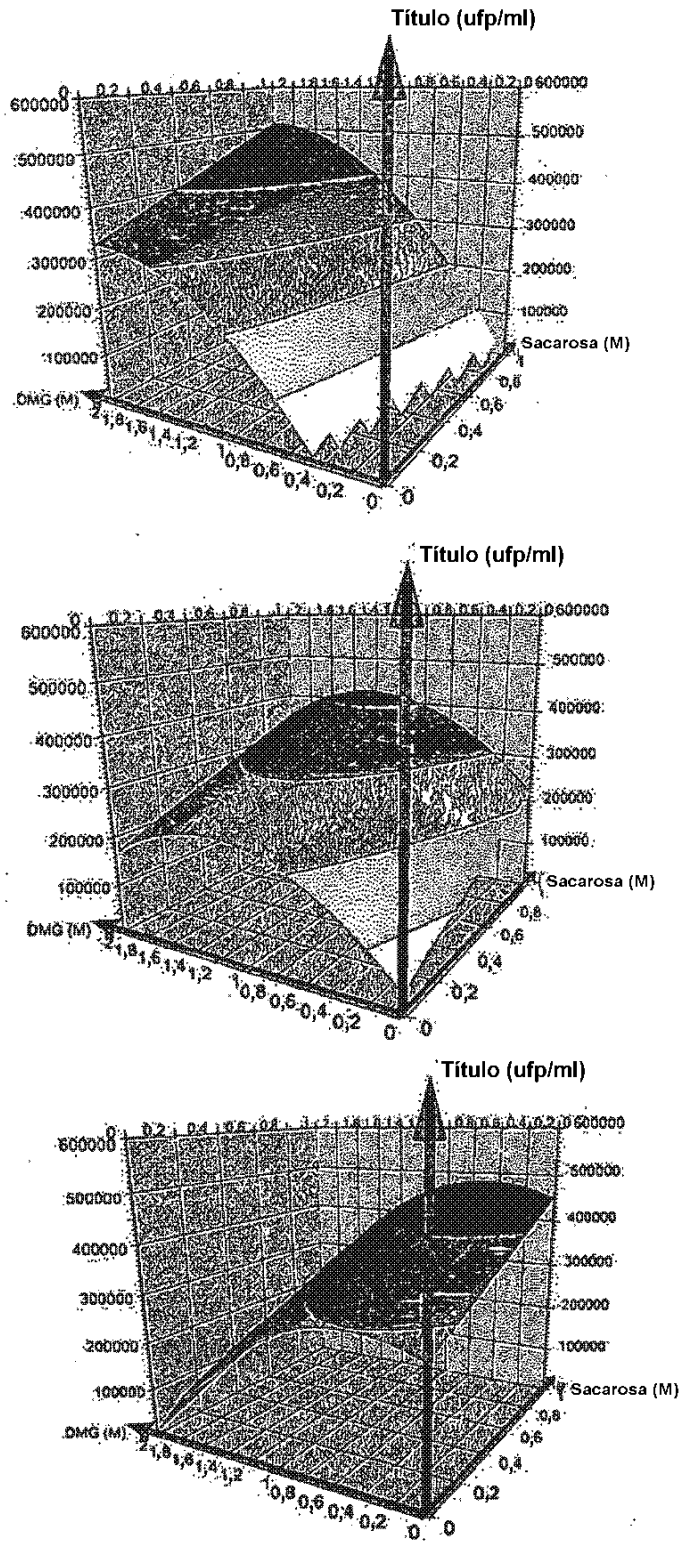


Figura 13

Componente	Unidade	Valor	Limite Inferior	Limite Superior	Sensibilidade
1. Dextrina	Free	0	0	11	EA
2. DMG	Free	0	0	3	SA
3. Rafinose	Free	0	0	100	SA

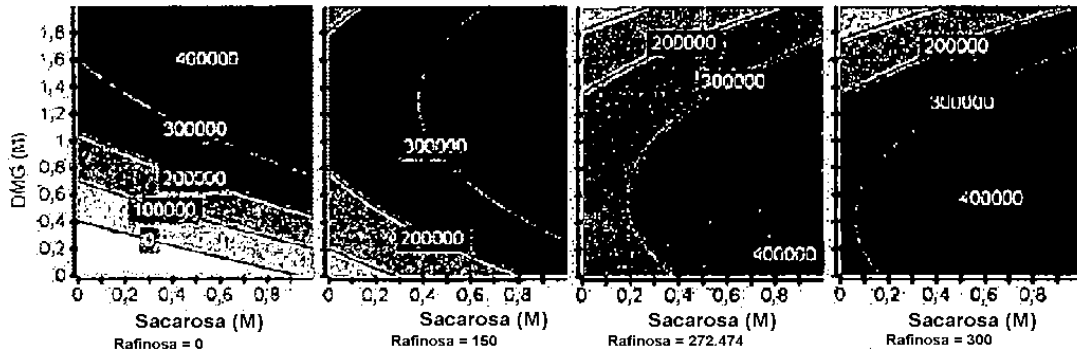
Resposta	Objetivo	Weight	Min	Target	Max
1. Thro	100000	1	1	100000	

Componente	2	3	4	5	6	7
Sucrose	DMG (M)	Rafinose	Thro	Water	DMG (M)	DMG (M)
1	0,65	0,6	10	271909	0,00000	0,00000
2	0	0	0	377569	0,00000	0,00000
3	0,2	0	100	303104	0	1,0613
4	1	1,6	000	014520	0	1,2211
5	4,9	1	150	338323	0	0,12392
6	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000

Figura 14

A



B

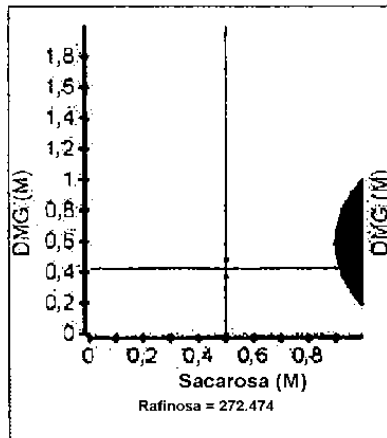


Figura 15

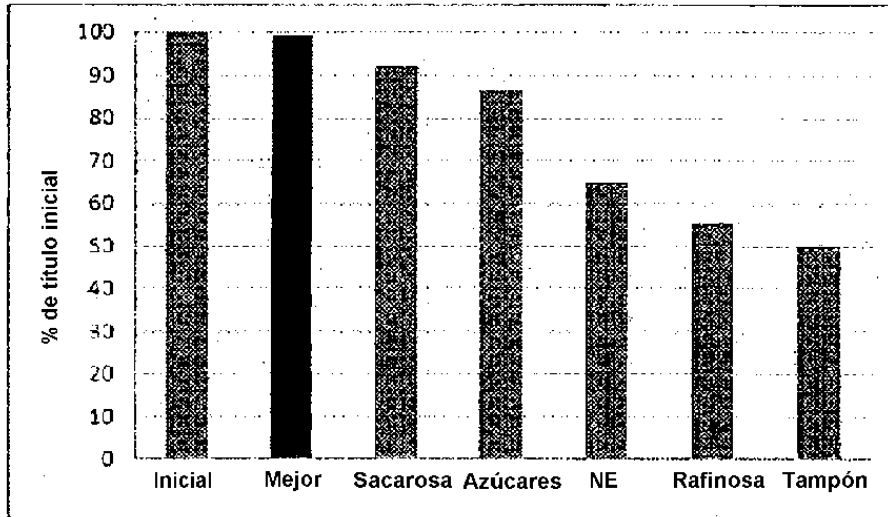


Figura 16

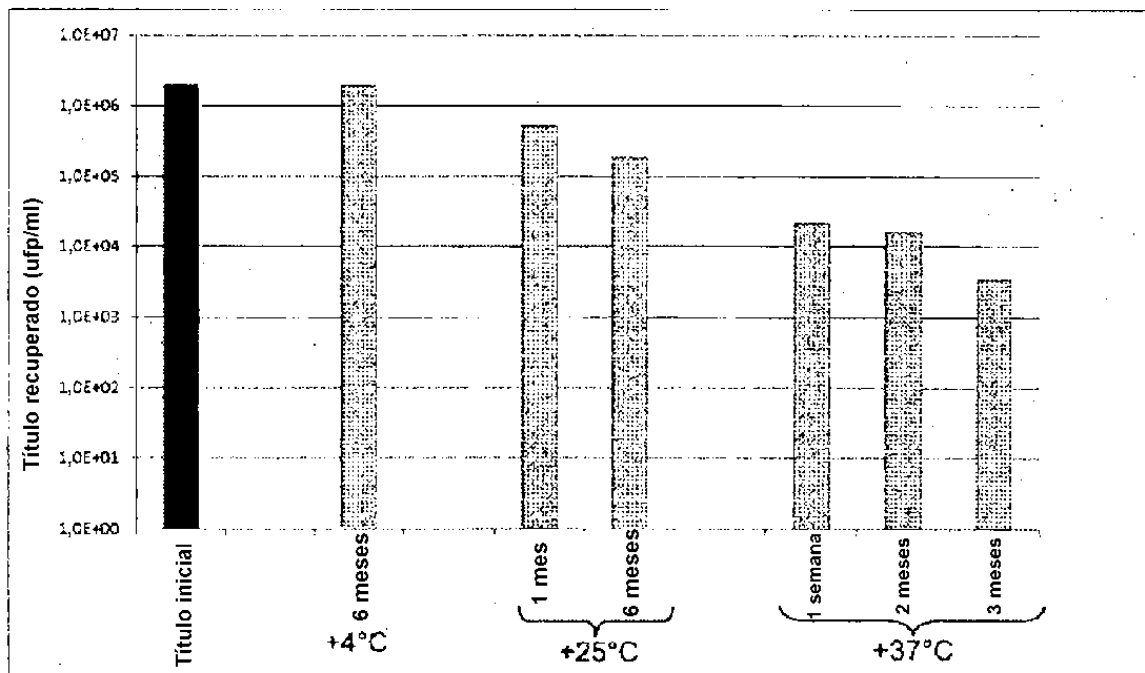


Figura 17

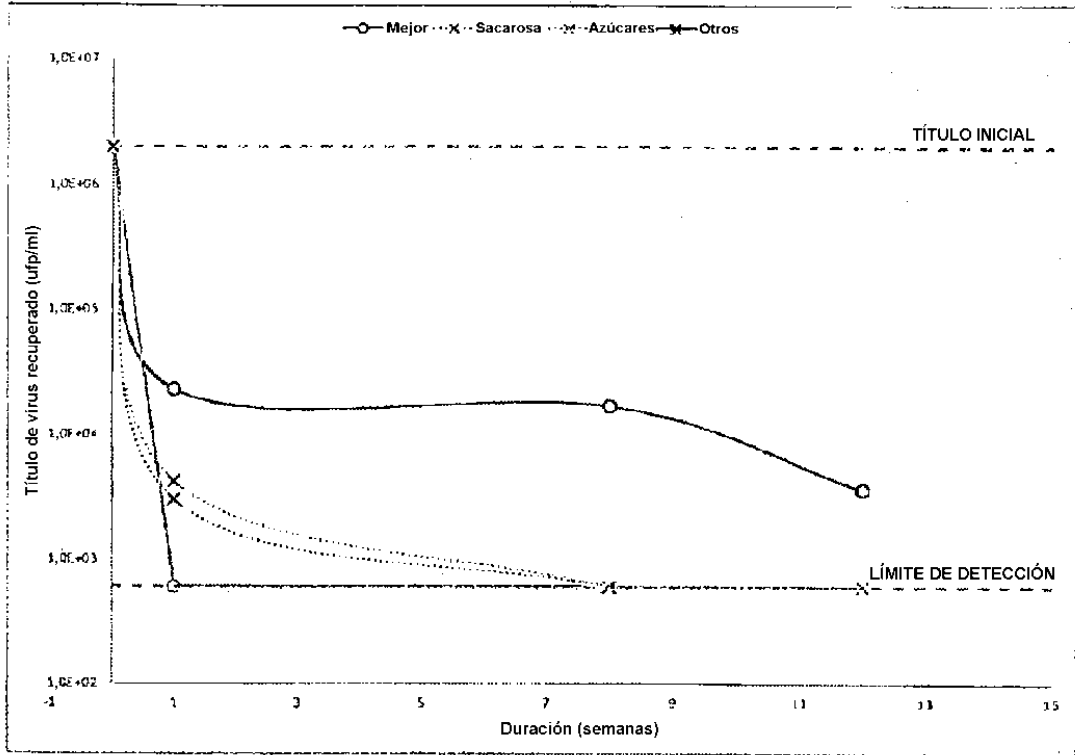


Figura 18

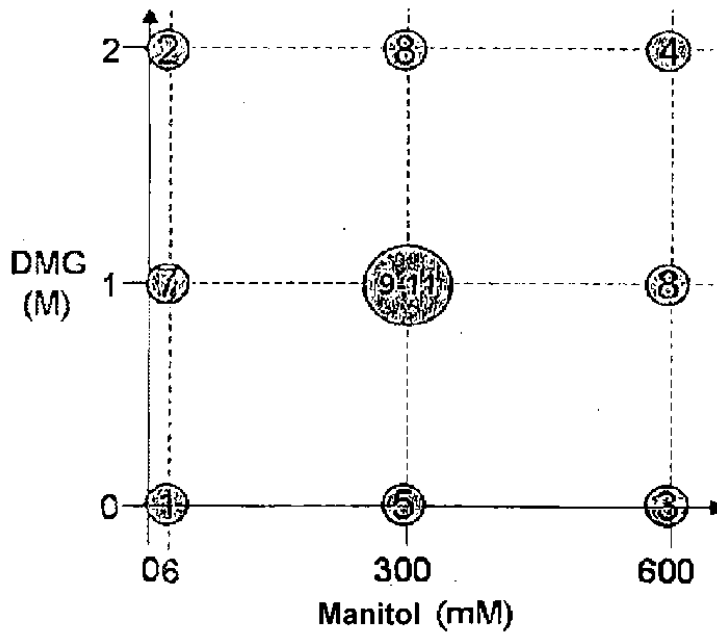


Figura 19

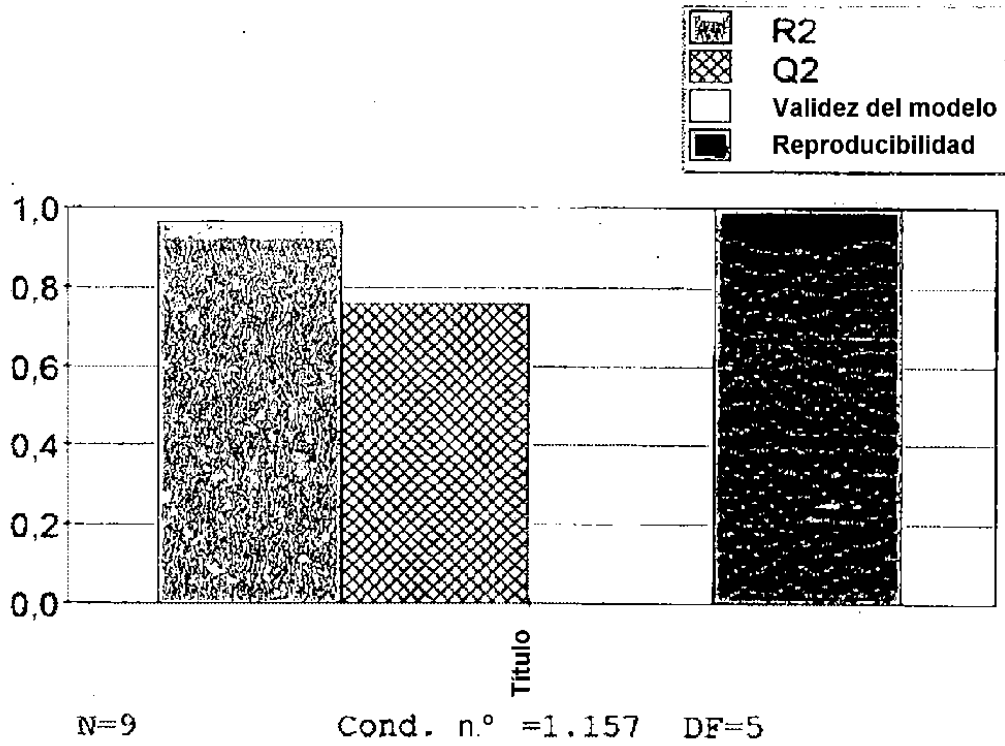


Figura 20

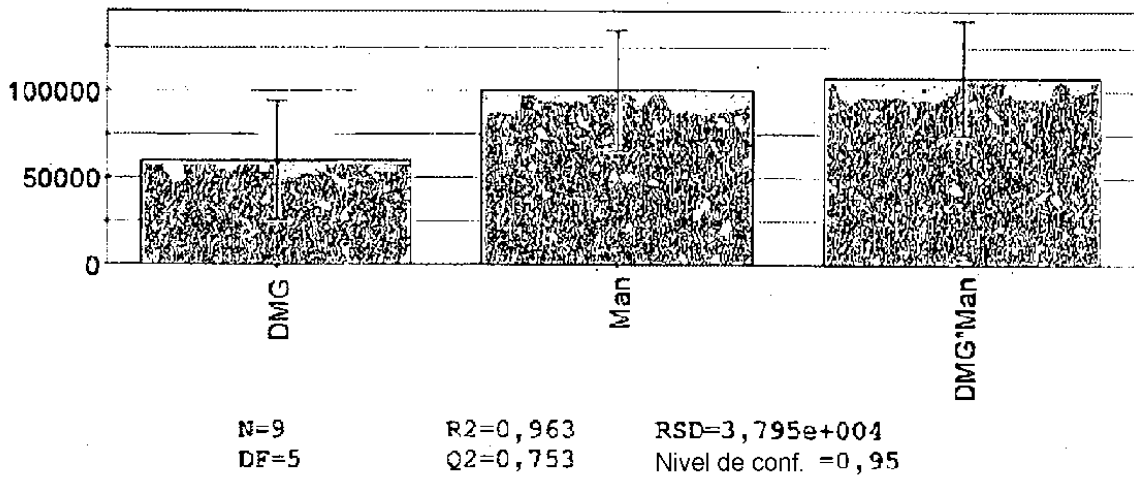


Figura 21

