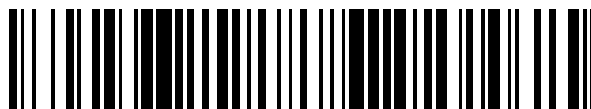


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 711 115**

51 Int. Cl.:

A61K 9/00 (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/10 (2007.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2007.01)
A61K 47/26 (2006.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)
A61K 35/76 (2015.01)
C12N 15/86 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.09.2014** **PCT/EP2014/069654**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **26.03.2015** **WO15040002**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.09.2014** **E 14766474 (2)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.11.2018** **EP 3046536**

54 Título: **Formulaciones de adenovirus mejoradas**

30 Prioridad:

19.09.2013 EP 13185200

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

30.04.2019

73 Titular/es:

JANSSEN VACCINES & PREVENTION B.V.
(100.0%)
Archimedesweg 4
2333 CN Leiden, NL

72 Inventor/es:

ADRIAANSEN, JANIK

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 711 115 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

Formulaciones de adenovirus mejoradas

CAMPO DE LA INVENCIÓN

5 La presente invención se refiere a formulaciones de adenovirus y a productos farmacéuticos relacionados para su uso, por ejemplo, en aplicaciones de terapia génica y/o de vacuna. En particular, se dan a conocer formulaciones líquidas para adenovirus en el presente documento, que mejoran la estabilidad adenoviral conservando la cantidad, potencia (infectividad) y calidad del adenovirus contenido cuando se almacenan en aproximadamente el intervalo de 2-8°C o mayor mientras que también es compatible con la administración parenteral.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

10 Los vectores de adenovirus se consideran los vehículos más eficaces y ampliamente usados para inserción génica. Un desafío permanente en el campo de la terapia génica y la investigación de vacunas es generar formulaciones líquidas de adenovirus que pueden estabilizar estos virus durante periodos de tiempo más prolongados dentro de un intervalo realista de temperatura de almacenamiento para productos farmacéuticos, tal como desde aproximadamente 2°C hasta aproximadamente 8°C.

15 La actividad biológica de un adenovirus depende de la integridad conformacional de al menos una secuencia de nucleótidos central rodeada por una estructura de cápside icosaédrica que consiste en las proteínas de la cápside. A diferencia de los fármacos orgánicos e inorgánicos tradicionales, estos son estructuras biológicas altamente complejas y agentes de estrés químico o físico menores pueden contribuir a la degradación de la partícula adenoviral. Una buena formulación de preparaciones de adenovirus es por tanto de crucial importancia para garantizar un término de
20 caducidad razonable, pero estabilizar estos vectores plantea retos particulares. Los adenovirus pueden perder potencia como resultado de inestabilidades físicas, incluyendo desnaturalización, agregación (formación de agregados tanto solubles como insolubles), precipitación y adsorción, así como inestabilidades químicas, incluyendo hidrólisis, desamidación y oxidación. Cualquiera de estas rutas de degradación puede conducir a una disminución de la actividad biológica, pero también puede dar como resultado potencialmente la formación de subproductos o derivados que tienen
25 toxicidad aumentada y/o inmunogenicidad alterada.

Por tanto, es necesario un enfoque adaptado para encontrar una formulación robusta para adenovirus que garantice la estabilidad a lo largo de un amplio intervalo de condiciones. Tendrán que optimizarse meticulosamente el tipo de tampón, el pH y excipientes especializados para mantener un adenovirus química, física y biológicamente estable. En vista de todos los factores que pueden variarse, está cargado de desafío el encontrar condiciones óptimas para formular
30 adenovirus, y la composición de una buena formulación es impredecible *a priori*.

Existen formulaciones liofilizadas y son estables. Sin embargo tienden a ser relativamente caras, requieren una manipulación que lleva mucho tiempo antes de la administración, y podría perderse potencia en cierta medida en el proceso de liofilización. Existen formulaciones líquidas que son estables en condiciones congeladas (-80°C), pero estas requieren instalaciones de envío especializadas y de almacenamiento caras, haciendo que sea casi imposible una
35 cadena de frío fiable, especialmente en la periferia de la red de distribución. Una formulación preferida para adenovirus es por tanto una formulación líquida que ofrece estabilidad adenoviral en un intervalo de temperatura de entre 2-8°C o mayor. Tal formulación puede almacenarse en una nevera normal y puede administrarse rápida y fácilmente.

Se han descrito previamente formulaciones líquidas para adenovirus, por ejemplo en Evans *et al.* 2004. Las mejores formulaciones ejemplificadas en dicha solicitud son formulaciones tamponadas con Tris que tienen un pH que oscila
40 entre 7.5 y 8.5. Se ha encontrado en el presente documento que dichas formulaciones son subóptimas para adenovirus. También se dan a conocer formulaciones para adenovirus en el documento WO 00/29024, que se refiere principalmente a técnicas de liofilización. Otras formulaciones para adenovirus que comprenden un poliol se mencionan en el documento WO 00/29024.

El documento US2005085427 se refiere a composiciones de SYN3, que contienen un vector adenoviral para interferón alfa 2b. Roberts-K-Evans. *Journal of Pharmaceutical Sciences, American Pharmaceutical Association*. 93, 10. 01.10.2004. 2458-2475 (XP007914498) trata sobre la estabilidad mejorada del adenovirus. El documento CN1852918 se refiere a formulaciones liofilizadas que comprenden un agente potenciador del suministro de SYN3 y un adenovirus recombinante que codifica un gen de interferón (por ejemplo, hidroxipropil-beta-ciclodextrina o detergentes).

Por consiguiente, existe la necesidad en la técnica de encontrar formulaciones que mejoren la estabilidad adenoviral conservando la cantidad y potencia del adenovirus contenido durante el almacenamiento a lo largo de un periodo de tiempo prolongado. La estabilidad adenoviral también debe retenerse en el caso de estrés de agitación durante el transporte o fuerzas de cizallamiento durante la producción o el uso clínico, y en condiciones climáticas que oscilan ampliamente, en particular a temperatura elevada o tras ciclos repetidos de congelación/descongelación. Además, la formulación debe ser adecuada para la vía de administración pretendida, debe tolerarse bien y debe tener
55 preferiblemente una composición con tan pocos componentes como sea posible. Es un objeto de la invención proporcionar tales formulaciones para adenovirus.

SUMARIO DE LA INVENCION

- Se ha encontrado y descrito en el presente documento, formulaciones para adenovirus que mejoran la estabilidad adenoviral conservando la cantidad y potencia (infectividad) y calidad del adenovirus en comparación con formulaciones dadas a conocer previamente. De manera notable, la combinación de un tampón citrato que tiene un pH que oscila entre 5.5 y 6.5 junto con hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HBCD) dio como resultado una formulación extraordinaria según la reivindicación 1 para la conservación de cantidad, potencia (infectividad) y calidad de adenovirus, mejorando con la misma la estabilidad adenoviral global en comparación con otras formulaciones conocidas en la técnica.
- Como con todos los excipientes usados para el desarrollo de formulaciones, algunos de los componentes presentes en la formulación según la presente invención se citan por separado en la técnica anterior. Sin embargo, es la combinación muy específica de varios componentes lo que proporciona a la presente formulación sus propiedades y potencial de estabilización extraordinarios. La formulación exacta según la reivindicación 1 no se dio a conocer en la técnica anterior. Además, no podría haberse previsto, basándose en la técnica anterior en este campo inherentemente impredecible, que dicha formulación proporcionaría tal estabilidad mejorada a los adenovirus.
- La presente invención se refiere por tanto a formulaciones de adenovirus estabilizadas y a productos farmacéuticos relacionados que pueden usarse, por ejemplo, en aplicaciones de terapia génica y/o de vacuna según la reivindicación 1.
- Las formulaciones según la presente invención comprenden un tampón citrato a un pH que oscila entre 5.5 y 6.5, y comprenden además hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HBCD). Las formulaciones comprenden adicionalmente una sal y un detergente no iónico. Opcionalmente, las formulaciones según la presente invención comprenden además un alcohol de 2 ó 4 carbonos. Las formulaciones adenovirales de la presente invención son propicias para el almacenamiento prolongado a de 2°C a 8°C o ≤-65°C, durante más de 6 meses, 1 año, 1.5 años, 2 años, o más.
- Las formulaciones de adenovirus de la presente invención comprenden a) un adenovirus recombinante en b) una disolución tamponada con citrato, que comprende además c) hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HBCD); d) una sal; y e) un detergente no iónico, en la que dicha formulación tiene un pH que oscila entre 5.5 y 6.5. Para conservar la estabilidad del adenovirus, es esencial que el pH de esta formulación oscile entre 5.5 y 6.5.
- Preferiblemente la formulación según la presente invención comprende adenovirus a un título que oscila entre aproximadamente 1×10^7 vp/ml y 1×10^{13} vp/ml.
- En una realización preferida según la presente invención, la concentración de citrato en la formulación oscila entre aproximadamente 5 mM y 30 mM.
- La hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HBCD) es el crioprotector preferido. HBCD está presente preferiblemente en una concentración que oscila entre aproximadamente el 1% (p/p) y el 10% (p/p).
- El cloruro de sodio (NaCl) es la sal preferida, que está presente preferiblemente a una concentración que oscila entre aproximadamente 20 mM y 200 mM.
- El polisorbato 80 es el detergente no iónico preferido que tiene preferiblemente una concentración que oscila entre aproximadamente el 0.005% (p/p) y el 0.5% (p/p).
- En una realización más preferida según la presente invención, la formulación tiene un pH que oscila entre aproximadamente 5.7 y 6.3, y comprende citrato a una concentración que oscila entre aproximadamente 5 y 30 mM; HBCD a una concentración que oscila entre el 1% (p/p) y el 10% (p/p); NaCl a una concentración que oscila entre 20 mM y 200 mM; polisorbato 80 a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0.01% (p/p) y el 0.05% (p/p).
- En otra realización preferida según la presente invención, la formulación tiene un pH que oscila entre aproximadamente 5.8 y 6.2, y comprende citrato a una concentración que oscila entre aproximadamente 15 y 25 mM; HBCD a una concentración que oscila entre el 3% (p/p) y el 8% (p/p); NaCl a una concentración que oscila entre 50 mM y 100 mM; polisorbato 80 a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0.01% (p/p) y el 0.03% (p/p).
- En una realización incluso más preferida, la formulación según la invención tiene un pH de aproximadamente 6 y comprende citrato a una concentración de aproximadamente 20 mM; HBCD a una concentración de aproximadamente el 5% (p/p); NaCl a una concentración de aproximadamente 75 mM; polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente el 0.02% (p/p).
- Se demostró en el presente documento que la adición de un alcohol de 2 ó 4 carbonos, en particular etanol, en la formulación de la presente invención, protegió de manera inesperadamente fuerte los adenovirus frente al daño por congelación/descongelación y, por consiguiente, actuó como crioprotector.
- Por tanto en una realización preferida, la formulación según la presente invención comprende además un alcohol de 2 ó 4 carbonos. En una realización incluso más preferida, la formulación según la invención comprende etanol. La concentración de etanol oscila preferiblemente entre aproximadamente el 0.1% (p/p) y el 1% (p/p).

En una realización preferida según la presente invención, la formulación tiene un pH que oscila entre aproximadamente 5.7 y 6.3, y comprende citrato a una concentración que oscila entre aproximadamente 5 y 30 mM; HBCD a una concentración que oscila entre el 1% (p/p) y el 10% (p/p); NaCl a una concentración que oscila entre 20 mM y 200 mM; polisorbato 80 a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0.01% (p/p) y el 0.05% (p/p); y etanol a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0.2% (p/p) y el 0.6% (p/p).

En otra realización preferida según la presente invención, la formulación tiene un pH que oscila entre aproximadamente 5.8 y 6.2, y comprende citrato a una concentración que oscila entre aproximadamente 15 y 25 mM; HBCD a una concentración que oscila entre el 3% (p/p) y el 8% (p/p); NaCl a una concentración que oscila entre 50 mM y 100 mM; polisorbato 80 a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0.01% (p/p) y el 0.03% (p/p); y etanol a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0.2% (p/p) y el 0.6% (p/p).

En una realización incluso más preferida, la formulación según la invención tiene un pH de aproximadamente 6 y comprende citrato a una concentración de aproximadamente 20 mM; HBCD a una concentración de aproximadamente el 5% (p/p); NaCl a una concentración de aproximadamente 75 mM; polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente el 0.02% (p/p) y etanol a una concentración de aproximadamente el 0.4% (p/p).

En otra realización preferida, la formulación según la invención tiene un pH de aproximadamente 6 y comprende citrato a una concentración de aproximadamente 20 mM; HBCD a una concentración de aproximadamente el 5% (p/p); NaCl a una concentración de aproximadamente 80 mM; polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente el 0.025% (p/p) y etanol a una concentración de aproximadamente el 0.4% (p/p).

En una realización incluso más preferida, la formulación según la invención tiene un pH de aproximadamente 6 y comprende citrato a una concentración de aproximadamente 20 mM; HBCD a una concentración de aproximadamente el 5% (p/p); NaCl a una concentración de aproximadamente 80 mM; polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente el 0.025% (p/p) y etanol a una concentración de aproximadamente el 0.4% (p/p).

En otra realización preferida de la presente invención las formulaciones son formulaciones líquidas (congeladas). En aún otra realización, las formulaciones de la presente invención son adecuadas para uso parenteral.

En una realización, las formulaciones según la presente invención están contenidas en un vial. En otra realización, las formulaciones están contenidas en una bolsa o una botella. En aún otra realización, las formulaciones están contenidas en una jeringa o un cartucho.

La presente invención también se refiere a un método de conservación de un adenovirus que comprende preparar una formulación según la presente invención.

En aún otra realización, la presente invención se refiere a un método de conservación de un adenovirus que comprende preparar una formulación tal como se describe en el presente documento y almacenar dicha formulación a una temperatura que oscila entre 2°C y 8°C.

La estabilidad a largo plazo potenciada a lo largo de un amplio intervalo de temperatura da como resultado un término de caducidad prolongado de las formulaciones de virus dadas a conocer en el presente documento, permitiendo un almacenamiento y una eventual administración al huésped de estas formulaciones a lo largo de un periodo preferiblemente de aproximadamente 1-2 años, o más con pérdidas aceptables en la potencia del virus(es decir de no más de 0.3 log en dos años a 2-8°C). Además, las formulaciones de la presente invención muestran estabilidad durante la exposición a temperaturas elevadas, ciclos prolongados de congelación/descongelación y agitación.

DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1. Pérdida de potencia (en log UI/ml) (Δ) de Ad26 durante condiciones aceleradas de temperatura a 25°C en la formulación B (rombos en blanco) y formulación de control (círculos rellenos). Se muestra la Δ potencia media (n=4), que refleja la potencia_{muestra sometida a estrés}-potencia_{muestra de control}. Se ha medido la potencia mediante QPA.

Figura 2. Pérdida de potencia (en log UI/ml) (Δ) de Ad35 durante condiciones aceleradas de temperatura a 25°C en la formulación B (rombos en blanco) y formulación de control (círculos rellenos). Se muestra la Δ potencia media (n=4), que refleja la potencia_{muestra sometida a estrés}-potencia_{muestra de control}. Se ha medido la potencia mediante QPA.

Figura 3. Punto de fusión térmica de Ad26 en la formulación B y la formulación de control. Se realizó un análisis de TMA (ensayo de fusión térmica) (n=3) para Ad26 con muestras de t=0.

Figura 4. Punto de fusión térmica de Ad35 en la formulación B y la formulación de control. Se realizó un análisis de TMA (ensayo de fusión térmica) (n=3) para Ad26 con muestras de t=0.

Figura 5. Valores de delta de Ct (Δ Ct) de Ad26 en la formulación B con y sin NaCl, EDTA, etanol y combinaciones de los mismos después de 69 días a 25°C. Los valores de Δ Ct se correlacionan directamente con una pérdida de potencia, en los que un número mayor significa más pérdida de potencia.

Figura 6. Valores de delta de Ct (ΔCt) de Ad26 en la formulación B con y sin NaCl, EDTA, etanol y combinaciones de los mismos después de 16 días a 35°C. Los valores de ΔCt se correlacionan directamente con una pérdida de potencia, en los que un número mayor significa más pérdida de potencia.

Figura 7. Valores de delta de Ct (ΔCt) de Ad26 en la formulación B con y sin NaCl, EDTA, etanol y combinaciones de los mismos después de 30 ciclos de congelación/descongelación seguido por 1 día de agitación. Los valores de ΔCt se correlacionan directamente con una pérdida de potencia, en los que un número mayor significa más pérdida de potencia.

Figura 8. Turbidimetría medida mediante la absorbancia a 350 nm de Ad26 en la formulación B con y sin NaCl, EDTA, etanol y combinaciones de los mismos de t=0 (círculos rellenos), 25°C durante 69 días (rombos en blanco), 35°C durante 16 días (triángulos rellenos) y 30 ciclos de congelación/descongelación seguido por agitación (rectángulos en blanco).

Figura 9. Fluorescencia intrínseca de Ad26 en la formulación B con y sin NaCl, EDTA, etanol y combinaciones de los mismos de t=0 (círculos rellenos), 25°C durante 69 días (rombos en blanco), 35°C durante 16 días (triángulos rellenos) y 30 ciclos de congelación/descongelación seguido por agitación (rectángulos en blanco).

Figura 10. Punto de fusión térmica de Ad26 en la formulación F y la formulación de control. Se realizó un análisis de TMA (ensayo de fusión térmica) (n=3) para Ad26 con muestras de t=0.

Figura 11. Representación gráfica por parejas para la probabilidad de éxito para la potencia de CQA (Δ Límite de potencia $\geq -0.30 \log UI/ml$) con condición de estrés de congelación/descongelación (FT, *freeze/thaw*) + agitación (AG) + almacenamiento a 35°C. La escala para la probabilidad de éxito es de desde 0.4 (gris claro) hasta 1 (negro). Se explota el dominio experimental completo. En el cuadrado blanco está el espacio de diseño propuesto basándose en la representación gráfica.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Tal como se mencionó previamente, existe la necesidad en la técnica de encontrar formulaciones que mejoren la estabilidad adenoviral conservando la cantidad y potencia del adenovirus contenido durante el almacenamiento a lo largo de un periodo de tiempo prolongado.

Varias referencias dan a conocer el uso de componentes específicos para la formulación de adenovirus. Altaras *et al.* dan a conocer citrato como parte de una gran lista de posibles inhibidores de la oxidación por radicales libres. Dicha lista también contiene la combinación de EDTA y etanol (EDTA/etanol), que se identifica como un inhibidor adicional de la oxidación por radicales libres. La formulación de la presente invención usa citrato como tampón y no como antioxidante.

Renteria *et al.* identifican la hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HBCD) como uno de los aditivos usados para fomentar la estabilidad de determinadas proteínas y evitar la agregación durante la administración nasal. Renteria *et al.* dan a conocer el uso de hidroxipropil-beta-ciclodextrina en el contexto de una formulación apropiada para la administración nasal que potencia la captación mucosa. Todas las proteínas son muy diferentes en comparación con los virus vivos tales como adenovirus, en cuanto a estructura, carga y tamaño. Por consiguiente, el mecanismo de estabilización para adenovirus es completamente diferente e impredecible en vista del mecanismo de estabilización para proteínas.

El documento WO029024 da a conocer hidroxipropil-beta-ciclodextrina como parte de una gran lista de posibles lioprotectores usados para preparar una formulación secada por congelación. El documento WO029024 se refiere a una composición secada por congelación en oposición a una composición líquida tal como se da a conocer en la presente invención. La ventaja de una formulación líquida es que es menos cara, y la manipulación antes de la administración lleva menos tiempo y es menos propensa a errores de reconstitución o dosificación clínica. Además, la ampliación a escala de los procesos de liofilización puede ser un empeño muy complicado.

Se ha encontrado y descrito en el presente documento, formulaciones para adenovirus que mejoran la estabilidad adenoviral conservando la cantidad y potencia (infectividad) y calidad del adenovirus en comparación con formulaciones dadas a conocer previamente.

Las formulaciones de la invención comprenden al menos un adenovirus recombinante. La construcción de vectores adenovirales se entiende bien en la técnica e implica el uso de técnicas convencionales de la biología molecular, tales como las descritas, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 2ª ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson *et al.*, Recombinant DNA, 2ª ed., Scientific American Books (1992), y Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), y otras referencias mencionadas en el presente documento. Brevemente, el vector adenoviral puede ser deficiente en al menos una función génica esencial en la región E1, por ejemplo, la región E1a y/o la región E1b, del genoma adenoviral que se requiere para la replicación viral. Tal como conoce el experto para producir adenovirus, en caso de deleciones de regiones esenciales del genoma del adenovirus, las funciones codificadas por estas regiones han de proporcionarse en trans, preferiblemente por la célula productora, por ejemplo integradas en el genoma, o en forma de los denominados plásmidos auxiliares o de adenovirus, cuando se produce el adenovirus recombinante.

La propagación de un adenovirus recombinante se ha descrito en detalle en: la patente estadounidense 6,492,169 o en el documento WO 03/104467 las patentes estadounidenses n.ºs 5,559,099, 5,837,511, 5,846,782, 5,851,806, 5,994,106, 5,994,128, 5,965,541, 5,981,225, 6,040,174, 6,020,191 y 6,113,913, y Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", capítulos 67 y 68, respectivamente, en Virology, B. N. Fields *et al.*, eds., 3ª ed., Raven Press, Ltd., Nueva York (1996), que se incorpora al presente documento como referencia. El vector adenoviral deficiente en la replicación puede generarse usando cualquier especie, cepa, subtipo, o mezcla de especies, cepas o subtipos, de un adenovirus o un adenovirus quimérico como fuente de ADN de vector (véanse por ejemplo los documentos WO 96/26281, WO 00/03029). En determinadas realizaciones de la presente invención, los serotipos de adenovirus humanos incluyen uno cualquiera de los serotipos 2, 4, 5, 7, 11, 26, 34, 35, 36, 48, 49 ó 50 o cualquier serotipo de adenovirus híbrido o mutado. En una realización preferida de la presente invención, el adenovirus recombinante es de serotipo 5, 26 ó 35 de adenovirus humano.

En realizaciones adicionales, el adenovirus de la invención es un adenovirus de simio, preferiblemente un adenovirus de chimpancé o gorila. Estos adenovirus tienen generalmente una baja seroprevalencia y/o bajos títulos de anticuerpos neutralizantes preexistentes en la población humana.

En realizaciones adicionales, el adenovirus de la invención comprende además ácido nucleico heterólogo. El experto conoce bien ácido nucleico heterólogo adecuado, y por ejemplo puede incluir marcos de lectura abiertos de transgén, por ejemplo marcos de lectura abiertos que codifican para polipéptidos frente a los que se desea una respuesta inmunitaria cuando se usa el vector para fines de vacunación, por ejemplo transgenes adecuados para generar una respuesta inmunitaria frente a la malaria (véase por ejemplo el documento WO 2004/055187), VIH, tuberculosis (véase por ejemplo el documento WO 2006/053871), determinados virus, etc., todo lo cual conoce bien el experto. De hecho, la naturaleza del transgén no es crítica para la presente invención, puede ser cualquier secuencia heteróloga de ácido nucleico, y así no requiere una explicación adicional en este caso.

El término "estabilidad" tal como se usa en el presente documento se refiere a la resistencia relativa a la degradación de partículas de adenovirus en una formulación que retiene su potencia en la escala temporal de su utilidad esperada. Preferiblemente, la potencia muestra una disminución de no más de 0.3 log en dos años a 2-8°C.

El término "potencia" tal como se usa en el presente documento se refiere a una medida de la actividad de adenovirus expresada en cuanto a las unidades infecciosas medidas en un ensayo de potencia basado en células, que se describe a continuación en el presente documento.

Una composición según la invención muestra una disminución de la potencia de no más de 0.4 log en 60 días y una disminución del título de no más de 0.3 log en 60 días en un estudio de estabilidad en condiciones aceleradas, estudio que se realiza mediante incubación de las formulaciones a 25°C ± 2°C durante de 1 a 3 meses.

Una composición según la invención también muestra una disminución de la potencia de no más de 0.2 log en 10 ciclos en un estudio en el que se someten viales a ciclos repetidos de congelación/descongelación seguido por 24 horas de agitación a temperatura ambiente en una orientación horizontal a 200 rpm.

Como "excipiente farmacéuticamente aceptable" se designa a cualquier sustancia inerte que se combina con una molécula activa, tal como un virus, para preparar una forma de dosificación agradable o conveniente. El "excipiente farmacéuticamente aceptable" es un excipiente que es no tóxico para los receptores con las dosificaciones y concentraciones usadas, y es compatible con otros ingredientes de la formulación que comprenden la preparación viral. Ejemplos de excipientes son crioprotectores, detergentes no iónicos, tampones, sales e inhibidores de la oxidación por radicales libres.

El término "subproducto" incluye productos no deseados, que restan valor o disminuyen la proporción de adenovirus terapéutico/profiláctico en una formulación dada. Los subproductos típicos incluyen agregados del adenovirus y fragmentos del adenovirus, que resultan de por ejemplo desnaturalización de proteínas, desamidación, hidrólisis o combinaciones de las mismas. Normalmente, los agregados son complejos que tienen un peso molecular mayor que la partícula de virus aislada.

Una formulación que mejora la estabilidad adenoviral, también denominada una "formulación estable" tal como se usa en el presente documento es una formulación en la que el adenovirus en la misma retiene esencialmente su integridad física y/o química y/o actividad biológica con el almacenamiento. Puede evaluarse la estabilidad determinando diferentes características tales como la cantidad (de adenovirus en una formulación), la potencia, y/u otros aspectos de calidad del adenovirus en la formulación a lo largo de un periodo de tiempo en determinadas condiciones de almacenamiento. Pueden medirse estas características de una formulación de adenovirus a temperaturas elevadas (predictivas de temperaturas en tiempo real) o en otras condiciones de estrés, por ejemplo pueden someterse formulaciones a incubación a 25°C o someterse a ciclos de congelación/descongelación y agitación con el fin de estudiar los efectos de diferentes formulaciones que maximizan el término de caducidad. Dichas características que determinan la estabilidad pueden determinarse mediante al menos uno de los métodos seleccionados del grupo que consiste en inspección visual, reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de partículas de virus (vp-QPCR), ensayo de potencia basado en QPCR (QPA), cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) y sedimentación centrífuga diferencial (DCS), ensayo de fusión térmica (TMA), turbidimetría y fluorescencia intrínseca.

Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa de partículas de virus (vp-QPCR)

La vp-QPCR se desarrolló para la cuantificación de partículas de adenovirus usando cebadores que seleccionan como diana una región de 100 pb del promotor de CMV del casete de transgén dentro del vector de adenovirus. Brevemente, este método de QPCR se basa en la actividad exonucleasa de Taq polimerasa, que da como resultado la degradación de una sonda fluorescente específica hibridada en la parte central del amplicón de 100 pb. La sonda se une covalentemente a un emisor de luz y un extintor, y su degradación libera el emisor del extintor con una emisión de fluorescencia consiguiente proporcionar a la cantidad de molde. Se obtiene valores cuantitativos a partir del ciclo umbral (Ct), el ciclo en el que el aumento de la señal de fluorescencia supera un valor umbral. El umbral para la detección de fluorescencia basada en ADN se fija ligeramente por encima del fondo. El número de ciclos en el que la fluorescencia supera el umbral se denomina el ciclo umbral (Ct) o, según las directrices de MIQE, el ciclo de cuantificación (Cq) (Bustin *et al*, 2009). Durante la fase de amplificación exponencial, la secuencia de ADN diana se duplica cada ciclo. Por ejemplo, una muestra de ADN de la que el Ct antecede al de otra muestra en 3 ciclos contenía $2^3 = 8$ veces más molde. Por consiguiente, un mayor valor de Ct representa una menor cantidad de ADN diana y un menor valor de Ct representa una alta disponibilidad de ADN diana. Puede realizarse la cuantificación absoluta comparando una curva patrón generada mediante una dilución en serie de un adenovirus en disolución madre del que se ha determinado la concentración mediante la densidad óptica a 260 nm (DO_{260}). Se representan gráficamente los valores de Ct del material de prueba frente a los valores de Ct de la curva patrón, lo que genera un número exacto y preciso de partículas de vector.

Cuando se usa como lectura después de incubación con células competentes E1 (QPA, véase a continuación), muestras más degradadas conducirán a mayores valores de delta de Ct ($t=0$ restado) y formulaciones más estabilizantes conducirán a menores valores de Ct.

Ensayo de potencia basado en QPCR (QPA)

Para cuantificar la potencia del adenovirus, la QPA combina QPCR con un ensayo de infectividad basado en cultivo tisular. El ensayo se basa en la observación experimental de que la aparición de ADN viral recién sintetizado es muy rápida después de la inoculación de una monocapa celular, y es proporcional a la concentración de introducción de virus a lo largo de un gran intervalo de multiplicidad de infección (MOI). Se inoculan diluciones de muestras (no diluidas hasta el punto final) sobre monocapas de células HEK293 en una placa de 96 pocillos. Se permite que avance la infección durante 3 horas a 35°C. Se aspiran los pocillos y se reponen con medio que no contiene adenovirus. Se incuban las placas durante 42 horas más antes de la lisis celular por medio de una disolución de Triton X-100 y una única etapa de congelación/descongelación para liberar el ADN de adenovirus. Se realiza una QPCR con lisados celulares diluidos según el método descrito anteriormente. Se calcula el título de infectividad mediante comparación con una curva patrón generada mediante los valores de Ct de una muestra de infectividad conocida, que se determina mediante valoración hasta el punto final. Alternativamente, puede expresarse la delta de potencia directamente como valores de Ct puesto que el título de infectividad, o potencia, se correlaciona directamente con los valores de Ct. Especialmente al comparar diferencias relativas en la potencia entre formulaciones, esto es un método rápido y fiable.

Cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC)

Para determinar ciertos aspectos de calidad de un adenovirus, pueden analizarse los perfiles de proteínas adenovirales mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC). La HPLC separa los componentes de una mezcla usando una variedad de interacciones químicas entre la muestra, la fase móvil (un tampón o disolvente) y la fase estacionaria (un material de relleno cromatográfico en una columna). Una bomba de alta presión mueve la fase móvil a través de la columna y un detector muestra el tiempo de retención (t_R ; tiempo entre la inyección de muestra y la aparición del máximo de pico) de las moléculas usando detección de absorbancia UV a 280 nm. La separación de RP-HPLC se basa en diferencias en la hidrofobicidad. La fase estacionaria apolar se compone de cadenas de alquilo hidrófobas (longitudes de cadena: C4, C8 y C18). La fase móvil polar es agua con el 0.1% de trifluoroacético (TFA). Los compuestos que se unen a las columnas se eluyen usando una concentración creciente de acetonitrilo con el 0.1% de TFA. En general, un analito con una mayor área superficial hidrófoba tiene un mayor tiempo de retención, mientras que la presencia de grupos polares reduce el tiempo de retención. Un perfil de RP-HPLC de adenovirus típico consiste en 10 ó 14 proteínas, incluyendo proteína central (VII), base de pentón (III) y hexón (II).

Sedimentación centrífuga diferencial (DCS)

La DCS es un método para medir distribuciones de tamaño de partícula (agregación) mediante sedimentación. En una centrífuga de disco, las partículas sedimentan en un gradiente de sacarosa (de viscosidad y densidad conocidas) bajo altas fuerzas gravitatorias según la ley de Stokes. La velocidad de sedimentación aumenta con el cuadrado del diámetro de partícula, de modo que las partículas que difieren en tamaño sólo en un pequeño porcentaje sedimentan a velocidades significativamente diferentes. El tiempo necesario para alcanzar el detector se usa para calcular el tamaño de las partículas. El intervalo de medición para este método es de aproximadamente 0.02 a 30 micrómetros.

Ensayo de fusión térmica (TMA)

El ensayo de fusión térmica (TMA) puede usarse para determinar la temperatura de fusión (T_f) de adenovirus en formulaciones experimentales, que es la temperatura a la que se desnaturaliza la cápside viral. Esta disgregación viral

puede medirse en tiempo real usando un colorante fluorescente de intercalación de ADNbc. Este colorante fluorescente sólo proporciona una señal de fluorescencia cuando se une a ADN, que se libera cuando se disgrega la partícula viral. El aumento de fluorescencia exponencial con la fusión de la cápside puede medirse usando una máquina de QPCR común durante un aumento gradual de temperatura. Se diluyen muestras hasta la misma concentración (el intervalo es de 4×10^9 a 1×10^{12} vp/ml) en las formulaciones específicas y se mezclan con colorante SYBRGreen (concentración final 1X) en un volumen de 50 µl. Se aumentó la temperatura 0.5°C cada 30 segundos partiendo de 30°C hasta 79°C. A partir de los datos sin procesar de fluorescencia, se calcular las derivadas primera y segunda y se lee la temperatura de fusión en la ordenada en el origen de la segunda derivada con el eje x. Mayores temperaturas de fusión (T_f) pueden ser indicativas de una formulación más estabilizante .

10 *Ensayo de turbidez*

La turbidimetría mide la pérdida de intensidad de luz transmitida debido a la dispersión de partículas en muestras (absorbancia aparente), detectada a una longitud de onda a la que las moléculas en la muestra no absorben luz (por ejemplo 350 nm para muestras en las que proteínas son el principal cromóforo). Cuando se agregan moléculas o forman complejos supramoleculares, la dispersión de luz, que era aleatoria cuando procedía de las partículas individuales, se vuelve ahora coherente, y de ese modo aumenta la intensidad medida. Esto hace que la dispersión de luz y la turbidimetría sean técnicas útiles para detectar agregación y formación o disociación de complejos.

En el ensayo de turbidez, se transfieren muestras por triplicado a una microplaca de fondo plano, transparente al UV. Se cubre la placa con un sello transparente al UV. Se registran espectros de absorbancia mediante un lector de microplacas a entre 230 y 500 nm, y se mide la absorbancia a 975 nm para determinar y posiblemente corregir diferencias en el camino óptico. Se incluyen en el ensayo muestras de control que consisten en las formulaciones sin el adenovirus para corregir la dispersión o absorción de componentes de la matriz, si se requiere. Se usa la absorbancia aparente a 350 nm como medida cuantitativa para la turbidez.

El ensayo de turbidez es indicativo de estabilidad para muestras de adenovirus. La agregación de virus conduce a un aumento de la turbidez y la disociación de la cápside a una disminución. La precisión del ensayo es < 5% (% de CV) a valores de turbidez > 1 UNT.

La turbidez obtenida para muestras sometidas a estrés siempre debe compararse con las muestras de control. Puesto que un aumento o una disminución después de estrés aplicado depende de la ruta de degradación y es específico para cada principio activo farmacéutico (API), no puede predecirse. Un cambio (mayor o menor) en comparación con las muestras de $t=0$ es indicativo de una formulación menos estable. Se espera que muestras sometidas a estrés comparables a las muestras de $t=0$ muestras sean más estables.

Ensayo de fluorescencia intrínseca

Las proteínas de la cápside adenoviral contienen aminoácidos aromáticos que reemiten luz después de la excitación, en particular triptófano y en menor grado tirosina y fenilalanina. El máximo de emisión y el rendimiento cuántico del triptófano dependen fuertemente de la polaridad de su entorno. En un entorno acuoso, polar (por ejemplo, la superficie de una proteína globular) el rendimiento cuántico es relativamente bajo, mientras que en un entorno apolar (por ejemplo, el interior de un agregado) el rendimiento cuántico aumenta. Esta característica hace que la fluorescencia del triptófano sea una herramienta útil para estudiar un cambio conformacional de proteínas, agregación e interacciones moleculares.

En el ensayo de fluorescencia intrínseca, se transfieren muestras por triplicado a una microplaca de fondo plano, transparente al UV. Se cubre la placa con un sello transparente al UV. Se mide la fluorescencia del triptófano mediante un lector de microplacas usando un filtro de excitación con una longitud de onda central de 280 nm y un ancho de banda de 10 nm, y un filtro de emisión con una longitud de onda central de 340 nm y un ancho de banda de 10 nm. Se usa óptica de fondo para minimizar la influencia del sello y la forma del menisco.

En la técnica, se sabe que la intensidad de fluorescencia es una medida sensible de la estabilidad de adenovirus. Puede observarse o bien un aumento o bien una disminución tras estrés, dependiendo de la naturaleza de los cambios que se producen en la muestra. Se espera que el desplegamiento de proteínas y la disociación de la cápside conduzcan a una disminución de la fluorescencia intrínseca, y se espera que la agregación conduzca a un aumento. La precisión del ensayo es < 5% (% de CV) en el intervalo usado.

La fluorescencia obtenida para muestras sometidas a estrés siempre debe compararse con las muestras de control. Puesto que un aumento o una disminución después de estrés aplicado depende de la ruta de degradación y es específico para cada principio activo farmacéutico (API), no puede predecirse. Un cambio (mayor o menor) en comparación con las muestras de $t=0$ es indicativo de una formulación menos estable. Las muestras sometidas a estrés que permanecen más próximas a los valores de muestra de $t=0$ muestra son más estables.

Un adenovirus “retiene su estabilidad física” en una formulación farmacéutica, si muestra, entre otras cosas, una pérdida mínima (es decir 0.3 log/2 años) en cuanto a cantidad y potencia, y no presenta modificaciones proteicas principales. Adicionalmente, no deben observarse signos de agregación, precipitación, cambio de color y/o claridad tras examen visual.

"Aproximadamente" tal como se usa en la presente solicitud significa $\pm 10\%$, a menos que se establezca de otro modo.

La presente invención se refiere a formulaciones que estabilizan un adenovirus y a productos farmacéuticos relacionados, preferiblemente para su uso en aplicaciones de terapia génica y/o de vacuna. Una formulación que contiene virus estabilizada preferida dada a conocer en el presente documento es una formulación líquida de adenovirus, que muestra estabilidad adenoviral mejorada cuando se almacena en el intervalo de aproximadamente 2-8°C a la vez que también es compatible con la administración parenteral. Sin embargo, estas formulaciones también pueden almacenarse a menores temperaturas, por ejemplo de -20°C o menor, -40°C o menor, -65°C o menor, -80°C o menor. También puede ser más estables a temperaturas superiores a 8°C, por ejemplo de 25°C o incluso mayor.

Estas formulaciones que pueden estabilizar un adenovirus comprenden un tampón citrato, hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HBCD), una sal y un detergente no iónico, así como componentes adicionales que potencian la estabilidad con respecto al virus añadido. El pH de dicho tampón se encuentra entre 5.5 y 6.5.

Las formulaciones de la presente invención proporcionan estabilidad a adenovirus a concentraciones de virus variables, mono- o multivalentes, y pueden administrarse a una variedad de organismos vertebrados, preferiblemente mamíferos y especialmente seres humanos. Las formulaciones virales estabilizadas de la presente invención son composiciones basadas en adenovirus, que pueden administrarse, por ejemplo, como vacuna que puede ofrecer una ventaja profiláctica a individuos previamente no infectados y/o proporcionar un efecto terapéutico.

Un aspecto preferido de la invención es una formulación para adenovirus recombinante (es decir, un adenovirus que contiene la totalidad o una parte de un transgén que se expresa dentro del huésped diana de manera posterior a la administración al huésped, tal como en cualquier metodología basada en vacunación génica o terapia génica para seres humanos/mamíferos disponible para el experto en la técnica) que muestra características de estabilidad potenciadas descritas en el presente documento con una concentración de virus en el intervalo de desde aproximadamente 1×10^7 vp/ml (partículas de virus/ml) a aproximadamente 1×10^{13} vp/ml. Un intervalo más preferido es de desde aproximadamente 1×10^9 hasta 1×10^{13} vp/ml, prefiriéndose especialmente una concentración de virus que es de desde aproximadamente 1×10^{10} hasta 5×10^{12} vp/ml. Las composiciones terapéuticas o profilácticas de las formulaciones de la presente invención pueden administrarse a un individuo en cantidades suficientes para tratar o prevenir el trastorno respectivo. La cantidad eficaz para administración a seres humanos puede variar, por supuesto, según una variedad de factores tales como el estado, el peso, el sexo y la edad del individuo. Otros factores incluyen el modo de administración. En una realización preferida, las formulaciones de la presente invención son adecuadas para uso parenteral.

Las formulaciones de la presente invención son disoluciones tamponadas con citrato que tienen un pH que oscila entre 5.5 y 6.5, comprenden además hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HBCD) y que comprenden opcionalmente un alcohol de dos o cuatro carbonos. Inesperadamente, se ha probado que dicha combinación es una formulación extraordinaria para la conservación de la cantidad, potencia (infectividad) y calidad de adenovirus, tal como se demuestra en el presente documento.

En una realización preferida, la concentración de citrato oscila entre aproximadamente 5 mM y 30 mM, por ejemplo entre aproximadamente 5 mM y 25 mM, por ejemplo entre aproximadamente 10 mM y 25 mM, por ejemplo de aproximadamente 20 mM.

Otro componente esencial en estas formulaciones que contribuye a la estabilización de virus a lo largo de grandes intervalos de temperatura y durante periodos de almacenamiento prolongados es HBCD, que se usa como crioprotector. En una realización preferida, la concentración de HBCD oscila entre aproximadamente el 1% (p/p) y el 10% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 3% (p/p) y el 8% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 4% (p/p) y el 6% (p/p), por ejemplo aproximadamente 5% (p/p).

Un componente adicional de las formulaciones de la presente invención es sal. La sal potencia la estabilidad viral. Un propósito de la inclusión de una sal en la formulación es lograr la fuerza iónica u osmolalidad deseadas y optimizar adicionalmente las interacciones electrostáticas. La sal está presente a una osmolalidad que es fisiológicamente aceptable para el huésped. Las contribuciones a la fuerza iónica pueden proceder de iones producidos por el compuesto tamponante así como de los iones de las sales no tamponantes. Las sales que son apropiadas para las formulaciones de la presente invención incluyen pero no se limitan a cloruro de sodio (NaCl), cloruro de calcio (CaCl_2) o cloruro de manganeso (MnCl_2). A diferencia de la técnica anterior, se mostró que el cloruro de magnesio (MgCl_2) era perjudicial para la estabilidad adenoviral. Por tanto, en una realización preferida la formulación según la presente invención está libre de cloruro de magnesio.

En una realización preferida, la formulación de virus según la presente invención comprende cloruro de sodio (NaCl). En una realización preferida, la concentración de cloruro de sodio oscila entre aproximadamente 10 mM y 250 mM, por ejemplo entre aproximadamente 20 mM y 200 mM, por ejemplo entre aproximadamente 30 mM y 150 mM, por ejemplo entre aproximadamente 50 mM y 100 mM, por ejemplo de aproximadamente 80 mM.

Las formulaciones de la presente invención comprenden al menos un detergente no iónico (también denominado tensioactivo no iónico) añadido para reducir la adsorción a las superficies del recipiente así como para proporcionar posiblemente un aumento de la estabilización del virus (por ejemplo reduciendo la agregación). Los detergentes no

iónicos para su uso en las formulaciones de la presente invención incluyen pero no se limitan a ésteres de ácidos grados de polioxietileno-sorbitano, incluyendo pero sin limitarse a polisorbato 80 (Tween 80®), polisorbato 60 (Tween 60®), polisorbato 40 (Tween 40®) y polisorbato 20 (Tween 20®), y la serie Pluronic de tensioactivos no iónicos (por ejemplo Pluronic 121).

5 En una realización preferida, la concentración de detergente no iónico oscila entre aproximadamente el 0.001% (p/p) y el 1% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 0.005% (p/p) y el 0.5% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 0.01% (p/p) y el 0.1% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 0.01% (p/p) y el 0.05% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 0.015% (p/p) y el 0.03% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 0.025% (p/p).

10 En una realización preferida, la formulación de virus según la presente invención comprende polisorbato 80. La concentración de polisorbato 80 oscila entre aproximadamente el 0.001% (p/p) y el 1% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 0.005% (p/p) y el 0.5% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 0.01% (p/p) y el 0.1% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 0.01% (p/p) y el 0.05% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 0.015% (p/p) y el 0.03% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 0.025% (p/p).

15 En una realización preferida, la formulación de virus según la presente invención comprende además EDTA. En una más realización preferida, la concentración de EDTA oscila entre aproximadamente 0.05 mM y 0.2 mM, por ejemplo entre aproximadamente 0.05 mM y 0.15 mM, por ejemplo entre aproximadamente 0.08 mM y 0.12 mM, por ejemplo entre aproximadamente 0.1 mM.

20 En otra realización preferida, la formulación de virus según la presente invención comprende además etanol. En una realización más preferida, la concentración de etanol oscila entre aproximadamente el 0.1% (p/p) y el 1% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 0.2% (p/p) y el 0.8% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 0.2% (p/p) y el 0.6% (p/p), por ejemplo entre aproximadamente el 0.4% (p/p).

En una realización preferida, cuando la formulación de virus según la presente invención comprende etanol no debe comprender necesariamente EDTA al mismo tiempo.

25 En vista de lo comentado anteriormente, la presente invención se refiere a una formulación que contiene un adenovirus, tal como un Ad5, Ad26 o Ad35 recombinante, que puede usarse por ejemplo en aplicaciones de terapia génica y/o de vacunación génica, que muestran propiedades de estabilidad mejoradas en comparación con la formulación de mejor rendimiento conocida en la técnica (dada a conocer en Evans *et al.* 2004) y que contiene al menos un tampón citrato, HBCD como crioprotector, una sal y un tensioactivo.

30 Una realización particular de la presente invención se refiere a tal formulación de adenovirus recombinante que está tamponada con citrato a un pH que oscila entre 5.5 y 6.5, y comprende además hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HBCD), una sal, un detergente no iónico y un alcohol de 2 ó 4 carbonos.

En una realización preferida según la presente invención, la formulación comprende un tampón citrato con un pH que oscila entre aproximadamente pH 5.5 y pH 6.5, comprende HBCD como crioprotector, NaCl como sal, polisorbato 80 como tensioactivo y un alcohol de 2 ó 4 carbonos como crioprotector sin precedentes adicional.

35 En otra realización preferida según la presente invención, la formulación comprende un tampón citrato con un pH que oscila entre aproximadamente pH 5.5 y pH 6.5, comprende HBCD como crioprotector, NaCl como sal, polisorbato 80 como tensioactivo y EDTA.

40 En otra realización preferida según la presente invención, la formulación comprende un tampón citrato con un pH que oscila entre aproximadamente pH 5.5 y pH 6.5, comprende HBCD como crioprotector, NaCl como sal, polisorbato 80 como tensioactivo y etanol como crioprotector sin precedentes adicional.

En otra realización preferida según la presente invención, la formulación comprende un tampón citrato con un pH que oscila entre aproximadamente pH 5.5 y pH 6.5, comprende HBCD como crioprotector, NaCl como sal, polisorbato 80 como tensioactivo. Esta formulación comprende además etanol y está libre de EDTA.

45 tiene un pH que oscila entre aproximadamente 5.9 y 6.2, y comprende citrato a una concentración que oscila entre aproximadamente 10 y 25 mM; HBCD a una concentración que oscila entre el 4% (p/p) y el 6% (p/p); NaCl a una concentración que oscila entre 70 mM y 100 mM; polisorbato 80 a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0.018% (p/p) y el 0.035% (p/p); y etanol a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0.3% (p/p) y el 0.45% (p/p).

50 En otra realización preferida según la presente invención, la formulación tiene un pH que oscila entre aproximadamente 5.8 y 6.2, y comprende citrato a una concentración que oscila entre aproximadamente 15 y 25 mM; HBCD a una concentración que oscila entre el 3% (p/p) y el 8% (p/p); NaCl a una concentración que oscila entre 50 mM y 100 mM; polisorbato 80 a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0.01% (p/p) y el 0.03% (p/p); y EDTA a una concentración que oscila entre aproximadamente 0.05 mM y 0.15 mM.

En otra realización preferida según la presente invención, la formulación tiene un pH que oscila entre aproximadamente 5.9 y 6.2, y comprende citrato a una concentración que oscila entre aproximadamente 10 y 25 mM; HBCD a una concentración que oscila entre el 4% (p/p) y el 6% (p/p); NaCl a una concentración que oscila entre 70 mM y 100 mM; polisorbato 80 a una concentración que oscila entre aproximadamente el 0.018% (p/p) y el 0.035% (p/p); y EDTA a una concentración que oscila entre aproximadamente 0.05 mM y 0.15 mM.

En una realización incluso más preferida de la presente invención la formulación está tamponada con citrato aproximadamente 20 mM a un pH de aproximadamente 6; HBCD está presente a una concentración de aproximadamente el 5% (p/p); NaCl está presente a una concentración de aproximadamente 80 mM; el tensioactivo es polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente el 0.025% (p/p); y EDTA está presente a una concentración de aproximadamente 0.1 mM.

En una realización incluso más preferida de la presente invención, la formulación está tamponada con citrato aproximadamente 20 mM a un pH de aproximadamente 6; HBCD está presente a una concentración de aproximadamente el 5% (p/p); NaCl está presente a una concentración de aproximadamente 80 mM; el tensioactivo es polisorbato 80 a una concentración de aproximadamente el 0.025% (p/p); y etanol está presente a una concentración de aproximadamente el 0.4% (p/p). Adicionalmente, pueden usarse combinaciones de los factores mencionados anteriormente.

En una realización, las formulaciones según la presente invención están contenidas en un vial tal como por ejemplo vial de vidrio de borosilicato tipo I DIN 2R. En otra realización, las formulaciones están contenidas en una bolsa. Las bolsas que contienen las formulaciones de la presente invención pueden comprender capas compuestas, por ejemplo, de copolímero de etileno-acetato de vinilo (EVA) o alcohol etilvinílico (EVOH). En aún otra realización de la presente invención, las formulaciones están contenidas en una jeringa.

Las formulaciones de virus recombinante descritas en el presente documento pueden administrarse al huésped vertebrado (preferiblemente un huésped mamífero y especialmente un receptor humano) mediante cualquier medio conocido en la técnica. Estas rutas de administración incluyen pero no se limitan a inyección intramuscular, inyección intraperitoneal, inyección intravenosa, administración por inhalación o intranasal, administración oral, administración sublingual, administración subcutánea, administración transdérmica, administración intradérmica, administración en las glándulas salivares intraductales, administración transcutánea o administración percutánea. En una realización preferida, la formulación de la presente invención es compatible con la administración parenteral.

Según las formulaciones dadas a conocer en el presente documento, la presente invención también se refiere a métodos de conservación de un adenovirus que comprenden preparar formulaciones que contienen virus tal como se da a conocer en el presente documento, dando como resultado tales formulaciones una estabilidad viral mejorada cuando se almacenan por debajo de -65°C y en el intervalo de aproximadamente 2-8°C y posiblemente mayor mientras son también compatibles con la administración parenteral, especialmente la administración parenteral a seres humanos.

Por tanto, otro aspecto de la presente invención se refiere a métodos de conservación de un adenovirus que comprenden preparar una formulación tal como se da a conocer en el presente documento y almacenar dicha formulación a una temperatura que oscila entre 2°C y 8°C.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar la presente invención sin limitarse, sin embargo, la misma a ellos.

Ejemplos

Ejemplo 1.

Diseño experimental y metodología

Después de haberse sometido a prueba varias formulaciones diferentes, una formulación superó a las demás. Esta nueva formulación se denominó "formulación B" y comprende el 5% (p/p) de HBCD, citrato 20 mM, el 0.02% (p/p) de PS-80 y NaCl 75 mM a un pH de 6.0.

Dos preparaciones adenovirales (Ad35.TB-S y Ad26.Mos1.Gag-Pol) (una que comprende un adenovirus de serotipo 35 (Ad35) y una que comprende un adenovirus de serotipo 26 (Ad26)) se han sometido a cambio de tampón usando columnas PD-10 (GE Healthcare) en la formulación B.

Ambas preparaciones adenovirales se han formulado también en una "formulación de control" que se describió en Evans *et al.* 2004 y que era la mejor formulación disponible hasta entonces. Dicha "formulación de control" comprende Tris 10 mM, histidina 10 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 75 mM, el 5% (p/p) de sacarosa, el 0.02% (p/p) de PS-80, EDTA 0.1 mM, el 0.4% (p/p) de EtOH, a un pH de 7.4.

Se usaron 12 columnas por formulación; se reunieron los eluatos, se esterilizaron por filtración y se almacenaron a 2-8°C en una botella de vidrio. Se tomaron muestras para la determinación del título viral mediante vp-QPCR y se ajustaron todos los títulos con la formulación de tampón apropiada a 1.7x10¹¹ vp/ml. Posteriormente, se llenaron con las formulaciones viales de vidrio (0.7 ml por vial), se taponaron y se taparon.

Se almacenaron las muestras de t=0 (control, 6 viales por grupo) directamente a $\leq -65^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, se incubaron seis viales por grupo (n=6) a 25°C y se congelaron a $\leq -65^{\circ}\text{C}$ a t=10, 20, 30, 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80 y 90 días hasta que se realizó el análisis de muestras mediante QPA por triplicado, por muestra.

- Además, se analizaron muestras de t=0 para detectar vectores en ambas formulaciones mediante TMA (ensayo de fusión térmica) para determinar la temperatura de fusión de la cápside. Una mayor temperatura de fusión se correlaciona con una mayor estabilidad térmica de la cápside viral. También se analizaron muestras de punto final (t=90 días) mediante cromatografía de líquidos de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC) y sedimentación centrífuga diferencial (DCS) y se compararon con controles de t=0.

Resultados y conclusión

- Después de completarse el estudio, se analizaron todas las muestras mediante QPA y se expresó la pérdida de potencia como deltas restando los valores de t=0. La formulación B, según la presente invención (rombos en blanco) superó significativamente ($p=1.44\text{E-}05$) a la formulación de control (círculos rellenos) conduciendo a menos degradación a lo largo del tiempo y a un término de caducidad predicho más largo (tabla 1) para ambos adenovirus (figuras 1 y 2). Con *Statistical Analysis System* (software SAS), se ajustaron modelos lineal (Ad26) y cuadrático (Ad35) con los datos de potencia usando el tiempo y el cuadrado del tiempo como efectos fijos. Aunque el efecto de "tiempo" fijo representa la disminución lineal de la potencia, el efecto de "tiempo*tiempo" fijo representa la curvatura de esta disminución. Se usaron ambos efectos en el modelo para evaluar su significación. El criterio de información de Akaike (AIC) es una medida para la calidad relativa del modelo estadístico, que tiene en cuenta la complejidad del modelo y su exactitud de ajuste. Cuanto menor es AIC, mejor se ajusta el modelo. En el modelo lineal, la pendiente representa la tasa de degradación de la potencia. Comparando las pendientes, puede identificarse el mejor tampón (menor pendiente).

- Los términos de caducidad corresponden a los puntos de tiempo para los que el límite inferior de este intervalo pasa bajo una especificación dada (es decir, disminución de la potencia). Para el modelo cuadrático, para calcular el término de caducidad, se tomaron los intervalos de confianza del 95% bilaterales alrededor de la media. Mantener sólo el límite inferior para la evaluación del término de caducidad conduce a un intervalo de confianza del 97.5% para el intervalo de confianza inferior univariante. Se promediaron las ordenadas en el origen (que reflejan la potencia a t=0) y se retiraron de los datos sin procesar y del modelo. Se calcularon los términos de caducidad para ambas formulaciones.

Tabla 1: Términos de caducidad a 25°C derivados del análisis estadístico de las curvas de degradación (figuras 1 y 2).

	Formulación B frente a control
Término de caducidad de Ad26	36.1% más largo
Término de caducidad de Ad35	50.0% más largo

- La RP-HPLC no mostró ningún signo de modificaciones de proteína de adenovirus ni oxidación. La DCS no reveló ningún signo de agregación. Además, la formulación según la presente invención condujo a una temperatura de fusión aumentada significativamente tanto para Ad26 (figura 3) como para Ad35 (figura 4) en comparación con la formulación de control, lo que indica la estabilidad aumentada del adenovirus en la formulación B.

Ejemplo 2

Diseño experimental y metodología

- Después de los experimentos descritos en el ejemplo 1, se modificó la formulación B añadiendo u omitiendo uno o varios componentes (NaCl, etanol, EDTA o combinaciones de los mismos) produciendo 8 formulaciones experimentales (A a H, véase la tabla 2) que se compararon con la formulación de control (descrita en Evans *et al.* y especificada anteriormente en el presente documento). Todas las formulaciones contienen el 5% de HBCD, citrato 20 mM y el 0.02% de PS-80. Tal como se indica en la tabla 2, las formulaciones comprenden además NaCl 75 mM, EDTA 0.1 mM y/o el 0.5% de etanol (EtOH). Se incubaron los adenovirus (Ad26) en estas 9 formulaciones durante 69 días a 25°C o 16 días a 35°C o se expusieron a 30 ciclos de congelación/descongelación seguido por agitación (1 día a temperatura ambiente). Se evaluó la pérdida de potencia mediante QPA y se expresó como valores de delta (t=0 restado) de Ct (ciclo umbral). Adicionalmente, se leyó la absorbancia a 350 nm como medida para la turbidez y se midió la fluorescencia intrínseca para detectar cambios proteicos conformacionales y agregación. Finalmente, se realizaron un TMA y vp-QPCR para determinar la temperatura de fusión y la razón vp/UI.

Tabla 2: Composición de la formulación. Todas las formulaciones contienen el 5% de HBCD, citrato 20 mM y el 0.02% de PS-80, algunas complementadas con NaCl: 75 mM, EDTA: 0.1 mM y/o etanol (EtOH): 0.5%(p/p).

Formulación	NaCl	EDTA	EtOH
A	-	-	-
B	+	-	-
C	-	+	-
D	+	+	-
E	-	-	+
F	+	-	+
G	-	+	+
H	+	+	+

Resultados y conclusión

Basándose en los resultados de estabilidad a 25°C mostrados en la figura 5, puede concluirse que la adición de NaCl en combinación con EDTA (C y D) o etanol (E y F) es claramente beneficioso para la estabilidad viral, en la que el etanol supera claramente al EDTA. Inesperadamente, la combinación tanto de EDTA como de etanol con o sin NaCl no conduce a una formulación más estable (G y H). Esto va en contra de lo que se habría esperado a partir de la técnica anterior, por ejemplo Altaras *et al.* 2005, y Evans *et al.* 2004 en los que la combinación específica de EDTA/EtOH a la que se hace referencia comúnmente como un inhibidor de la oxidación por radicales libres y con el mismo un gran potenciador de la estabilidad adenoviral.

Pasando a un modelo más riguroso, 35°C durante 16 días, el poder de discriminación se volvió más pronunciado, tal como puede observarse en la figura 6. Claramente, la adición de NaCl mejora la estabilidad y el efecto beneficioso del etanol se confirma en la figura 6. Sorprendentemente, la combinación de EDTA junto con etanol, con o sin NaCl, tiene un claro efecto negativo sobre la estabilidad viral. Esto va en contra de la percepción común de que la combinación de EDTA/EtOH rinde bien como inhibidor de la oxidación por radicales libres (por ejemplo Altaras *et al.* 2005, y Evans *et al.* 2004). Tomados en conjunto, ambos agentes de estrés térmico muestran el efecto beneficioso de NaCl en combinación con o bien EDTA o bien etanol en esta formulación particular.

Para investigar el rendimiento de las formulaciones con una ruta de degradación diferente, se expusieron dichas formulaciones (A a H) a un ciclo de congelación/descongelación y estrés de agitación (figura 7). Los efectos observados son tanto pronunciados como inesperados. Claramente, el EDTA (C y D) no tuvo ningún efecto. Por otro lado, el etanol protegió fuertemente frente al daño por congelación/descongelación y, por consiguiente, actuó como crioprotector (E a H).

Se han confirmado estos resultados impredecibles mediante lecturas de absorbancia a 350 nm en un ensayo de turbidimetría (figura 8). La congelación/descongelación (cuadrados en blanco en la figura 8) condujeron a una disminución de la turbidez en comparación con t=0, en las formulaciones sin etanol. Lo más probable es que esta disminución se deba a la disgregación de partículas virales. En línea con estas observaciones, la tensión por temperatura en condiciones aceleradas (triángulos rellenos en la figura 8) también dio como resultado una disminución de la turbidez en formulaciones libres de etanol, mientras que la formulación con etanol, específicamente la formulación F, no presenta cambios significativos en comparación con las muestras de t=0 (círculos negros en la figura 8).

Además, la fluorescencia intrínseca (Figura 9) confirma además las observaciones anteriores. La formulación sin etanol condujo a una disminución sustancial de la fluorescencia del triptófano después del estrés de congelación/descongelación en comparación con t=0 (cuadrados en blanco en la figura 9) lo que indica graves cambios conformacionales en la cápside viral. En marcado contraste, las formulaciones con etanol protegen al virus frente a este agente de estrés. El estrés térmico sólo tuvo un impacto menor sobre las formulaciones que contienen etanol.

Los datos de TMA revelaron una temperatura de fusión aumentada significativamente de la formulación F en comparación con la formulación de control (figura 10), lo que es indicativo de una cápside viral más estable en la formulación F.

De manera importante, la razón vp/UI, que refleja la proporción infecciosa de la preparación viral (indicativa de la calidad de las partículas de virus), reveló mayores valores (menos partículas infecciosas por cantidad total de partículas) en la

formulación de control en comparación con la formulación F después de la exposición a condiciones de temperatura aceleradas (25°C), véase la tabla 3. Esto muestra que la formulación F puede conservar la infectividad de adenovirus en una medida mucho mayor en comparación con la formulación de control.

Tabla 3: razones vp/UI para la formulación F y la formulación de control de t=0 y t=61 a 25°C

	Sin estrés	Sometido a estrés
Formulación de control	39	93
Formulación F	32	61

5 Ejemplo 3.

Diseño experimental y metodología

Para definir el espacio de diseño de tampón de formulación, se evaluó el intervalo de robustez para cada excipiente. Después de haberse seleccionado los factores, se definió un intervalo experimental para cada componente tal como se notifica en la tabla 4.

- 10 Se siguió el enfoque de diseño de experimento (DOE) para mapear el espacio experimental. Usando un diseño con un nivel bajo y uno alto para cada uno de seis factores (tabla 4), se prepararon 15 formulaciones (incluyendo 3 puntos centrales) para estudiar el efecto de cada factor y posibles interacciones entre los factores (tabla 5) con alto poder estadístico.

Tabla 4: Factores y niveles usados para recopilar el espacio experimental para el estudio

Tampón F de factor de formulación		Tampón F de form. de nivel objetivo	Nivel bajo	Nivel alto
Composición de tampón	pH	6.0	5.8	6.2
	Citrato (mM)	20	10	25
	HBCD (p/p)	5	3	6
	EtOH (p/p)	0.4	0.3	0.5
	PS-80%(p/p).	0.02	0.015	0.04
	NaCl (mM)	75	50	100

- 15 **Tabla 5: Diseño del experimento. Se prepararon independientemente quince formulaciones, incluyendo tres puntos centrales (filas en gris), tras los factores y niveles usados para recopilar el espacio experimental para el estudio.**

Nombre	pH	Citrato	HBCD	EtOH	PS-80	NaCl	Comentarios
F-01	6.2	20	3	0.5	0.04	50	
F-02	5,8	25	3	0.3	0.04	75	
F-00.1	6	20	5	0.4	0.02	75	punto central
F-03	6	10	3	0.3	0.015	50	
F-00.2	6	20	5	0.4	0.02	75	punto central
F-04	6	25	6	0.5	0.04	100	
F-00.3	6	20	5	0.4	0.02	75	punto central
F-05	6.2	25	6	0.3	0.02	50	
F-06	5.8	10	6	0.4	0.04	50	
F-07	6.2	10	6	0.5	0.015	75	

F-08	5.8	10	3	0.5	0.02	100	
F-09	6.2	25	3	0.4	0.015	100	
F-10	5.8	20	6	0.3	0.015	100	
F-11	5.8	25	5	0.5	0.015	50	
F-13	6.2	10	5	0.3	0.04	100	

Para evaluar los niveles apropiados para cada excipiente y pH (la robustez de la formulación), se llenó cada grupo en viales de vidrio y se sometieron a 10 ciclos de congelación/descongelación (F/T), seguido por 1 día agitación a 200 rpm a temperatura ambiente (RT) y almacenamiento durante 7 días a 35°C (modelo de degradación en condiciones aceleradas). Se usó entonces la potencia mediante QPA (n=3) como lectura.

- 5 Se sometió a cambio de tampón una preparación de Ad26 usando columnas PD-10 (GE Healthcare) en cada una de las formulaciones enumeradas en la tabla 5. Se reunieron los eluatos de cada formulación, se esterilizaron por filtración y se almacenaron a 2-8°C en una botella de vidrio. Se tomaron muestras para la determinación del título viral mediante vp-QPCR y se ajustaron todos los títulos con la formulación apropiada a 1×10^{11} vp/ml. Posteriormente, se llenaron con las formulaciones viales de vidrio (0.75 ml por vial), se taponaron y se taparon. Se almacenaron las muestras de t=0 (control, 6 viales por grupo) directamente a $\leq 65^\circ\text{C}$. Posteriormente, se incubaron cuatro viales por grupo (n=4) con congelación/descongelación y se almacenaron 35°C durante 7 días (tabla 6) hasta que se realizó el análisis de muestras mediante QPA por triplicado, por muestra.
- 10

Resultados y conclusión

- 15 Después de completarse el estudio, se analizaron todas las muestras mediante QPA y se expresó la pérdida de potencia se expresó como deltas restando los valores de t=0. Se usaron estos datos para el análisis estadístico.

- El resultado del análisis estadístico fue la probabilidad de éxito, en el que el éxito se define como una formulación estable, que satisface las especificaciones fijadas para el atributo de calidad crítico seleccionado (CQA): la potencia. Se llevaron a cabo pruebas de equivalencia entre T0 y después del estrés: para comparar la equivalencia, se definieron criterios de aceptación sobre la máxima pérdida de potencia (UI/ml) que puede tolerarse: en este experimento se definió la pérdida de potencia tolerada como $\Delta \text{Límite de potencia} \geq -0.30 \log \text{UI/ml}$.
- 20

Los datos experimentales obtenidos se muestran en la tabla 6 y se usaron para reducir el dominio experimental y calcular un espacio de diseño, basándose en la potencia.

- Los datos contienen 45 observaciones. Hay 12 tampones diferentes que se han sometido a prueba en triplicados y uno adicional que se ha preparado tres veces por separado y se ha sometido a prueba cada preparación independiente por triplicado (puntos centrales).
- 25

Tabla 6: Valores experimentales para cada formulación expresados como $\Delta \text{Potencia} (\log_{10} \text{IU/ml})$

Nombre de grupo	$\Delta \text{Potencia} (\log_{10} \text{IU}_{\text{por ml}})$	Observaciones
F-01	-0.35	
F-01	-0.29	
F-01	-0.33	
F-02	-0.29	
F-02	-0.29	
F-02	-0.32	
F-00.1	-0.28	PUNTO CENTRAL
F-00.1	-0.27	PUNTO CENTRAL
F-00.1	-0.26	PUNTO CENTRAL
F-03	-0.3	
F-03	-0.33	

ES 2 711 115 T3

F-03	-0.24	
F-00.2	-0.2	PUNTO CENTRAL
F-00.2	-0.28	PUNTO CENTRAL
F-00.2	-0.22	PUNTO CENTRAL
F-04	-0.18	
F-04	-0.26	
F-04	-0.24	
F-00.3	-0.21	PUNTO CENTRAL
F-00.3	-0.18	PUNTO CENTRAL
F-00.3	-0.16	PUNTO CENTRAL
F-05	-0.2	
F-05	-0.18	
F-05	-0.2	
F-06	-0.33	
F-06	-0.25	
F-06	-0.25	
F-07	-0.18	
F-07	-0.27	
F-07	-0.14	
F-08	-0.31	
F-08	-0.28	
F-08	-0.25	
F-09	-0.28	
F-09	-0.26	
F-09	-0.2	
F-10	-0.27	
F-10	-0.26	
F-10	-0.26	
F-11	-0.31	
F-11	-0.27	
F-11	-0.25	
F-13	-0.22	
F-13	-0.15	
F-13	-0.18	

Se ha ajustado el siguiente modelo a los datos:


```

delta_log_potency[i] ~ normal(mu[i], sigma);
for(i in 1:Nobs){
mu[i] <- alpha_0 +
alpha_pH * pH[i] +
5 alpha_Citrate * Citrate[i] +
alpha_HBCD * HBCD[i] +
alpha_EtOH * EtOH[i] +
alpha_PS_80 * PS_80[i] +
alpha_NaCl * NaCl[i] +
10 alpha_HBCD2 * HBCD[i] * HBCD[i] +
alpha_PS_802 * PS_80[i] * PS_80[i] +
alpha_pH_HBCD * pH[i] * HBCD[i] +
alpha_pH_NaCl * pH[i] * NaCl[i] +
alpha_r_Batch[batch[i]];
15 donde alpha-r-batch representa el lote aleatorio y sigma el error residual.

```

Para obtener predicciones a partir del modelo para obtener un enfoque de espacio de diseño basado en riesgos, se ha adoptado el marco bayesiano porque puede derivarse fácilmente la distribución conjunta predictiva del CQA dados los parámetros de formulación (véanse Peterson *et al.* y Lebrun *et al.*). El espacio de diseño basado en riesgos se define usando la siguiente declaración de probabilidad:

$$\text{Espacio de diseño} = \{\tilde{x} \in \chi \mid P(\text{CQAs} \in \Lambda \mid X = \tilde{x}, \text{datos}) \geq \pi\} \quad (1)$$

En otras palabras, el espacio de diseño es una región del dominio experimental χ (a menudo denominado espacio de conocimiento) donde la probabilidad posterior de que los CQA estén dentro de las especificaciones (Λ), es mayor que un nivel de calidad especificado π , dados los datos observados. Esta notación lleva implícita la inclusión de la incertidumbre incluida en el modelo estadístico. La probabilidad es una medida directa de las garantías para satisfacer conjuntamente las especificaciones. Para calcular esta probabilidad, los modelos estadísticos pueden escribirse como la siguiente ecuación lineal genérica. Para el CQA de orden j , se ajusta un modelo:

$$y_i = Xb_i + e_i, \text{ siendo } e_i \sim N(0, \sigma_i^2) \quad (2)$$

donde y_i es cualquier transformación aplicada al CQA de orden i para obtener buenas propiedades estadísticas (por ejemplo, identidad, transformaciones log o logit), $i = 1, \dots, 7$. Los parámetros del modelo b_i y σ_i^2 han de estimarse (véanse los artículos anteriores).

Se calcula la probabilidad posterior de la ecuación (1) a partir de la distribución predictiva de nuevas respuestas, identificadas como la siguiente distribución de Student (se retiran los índices i para mayor simplicidad):

$$\tilde{y} \mid \tilde{x}, \text{datos} \sim t_{n-p}(\tilde{x}\hat{\beta}, S) \quad (3)$$

Esta distribución de Student de tres parámetros tiene $n - p$ grados de libertad (para n observaciones y p parámetros del modelo), está centrada en la recta de regresión media $\tilde{x}\hat{\beta}$, calculada a partir de la estimación de mínimos cuadrados habitual de β : $\hat{\beta} = (X'X)^{-1}X'y$.

$S = a \cdot (1 + \tilde{x}'(X'X)^{-1}\tilde{x})$, donde el parámetro a es la suma residual de cuadrados, es decir, $a = (y - X\hat{\beta})'(y - X\hat{\beta})$. Por tanto, S define la escala de la distribución de Student. Se calcula el estimador de varianza como $S/(n - p)$.

Para explorar el dominio experimental, no se recomienda crear una red con 5 factores (debido a un problema de dimensionalidad: si se evaluaran 2 niveles por factor, daría como resultado una red de tamaño 25; si se evaluaran 10 niveles por factor, conduciría a una red de tamaño 105, etc.). En su lugar, se crearon varias muestras aleatorias y se exploraron de la siguiente manera:

a) Se eligieron condiciones operativas (ajustes de factor) (distribuidas uniformemente a lo largo de $\hat{x}_i$ de alto número dentro del dominio experimental

b) Para cada condición operativa: llevar a cabo un alto número de simulaciones:

Extraer n^* muestras $\tilde{y}_{ij} | \hat{x}_j$, datos ($i = 1, \dots, n^*$) de las distribuciones predictivas como en la ecuación (3), para cada CQA

c) A partir de las diferentes simulaciones de predicción de CQA, calcular la proporción de muestras dentro de las especificaciones

Esta proporción es la estimación de probabilidad posterior para obtener resultados de calidad dados los atributos de calidad críticos y sus especificaciones. Finalmente, se propone evaluar visualmente la distribución operativa aleatoria con representaciones gráficas por parejas de la proyección de los resultados en espacios bidimensionales, para identificar un espacio de diseño (figura 11).

Entonces se adaptaron los cálculos y se redujeron los intervalos de factor para maximizar la probabilidad de éxito para la potencia de CQA en estos intervalos (tabla 7), que reflejan los denominados intervalos operativos normales (NOR) y el espacio de diseño. Los intervalos mostrados en la tabla 7 garantizan la mayor probabilidad de éxito para tener una formulación estable. Estos intervalos garantizan por tanto una estabilidad de producto óptima.

Tabla 7: Espacio de diseño con intervalos de factor (NOR) seleccionados

Factor de formulación	Especificación
pH	5.9-6.2
Citrato (mM)	10-25
HBCD (p/p)	4-6
EtOH (p/p)	0.3-0.45
PS-80%(p/p).	0.018-0.035
NaCl (mM)	70-100

Bibliografía

Altaras N E et al. "Production and formulation of adenovirus vectors", Advances in biochemical engineering, Springer, Berlin, DE, vol. 99, 1 de noviembre de 2005.

Box, G. E., Hunter, W.G., Hunter, J.S., Hunter, W.G., "Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery", 2nd Edition, Wiley, 2005.

Bustin et al. 2009, "The MIQE Guidelines", Clinical Chemistry 55:4.

Evans RK, Nawrocki DK, Isopi LA, Williams DM, Casimiro DR, Chin S, Chen M, Zhu DM, Shiver JW, Volkin DB. "Development of stable liquid formulations for adenovirus-based vaccines", J Pharm Sci. 2004 Oct;93(10):2458-75.

Lebrun et al., Journal of Biopharmaceutical Statistics, 23: 1330–1351, 2013.

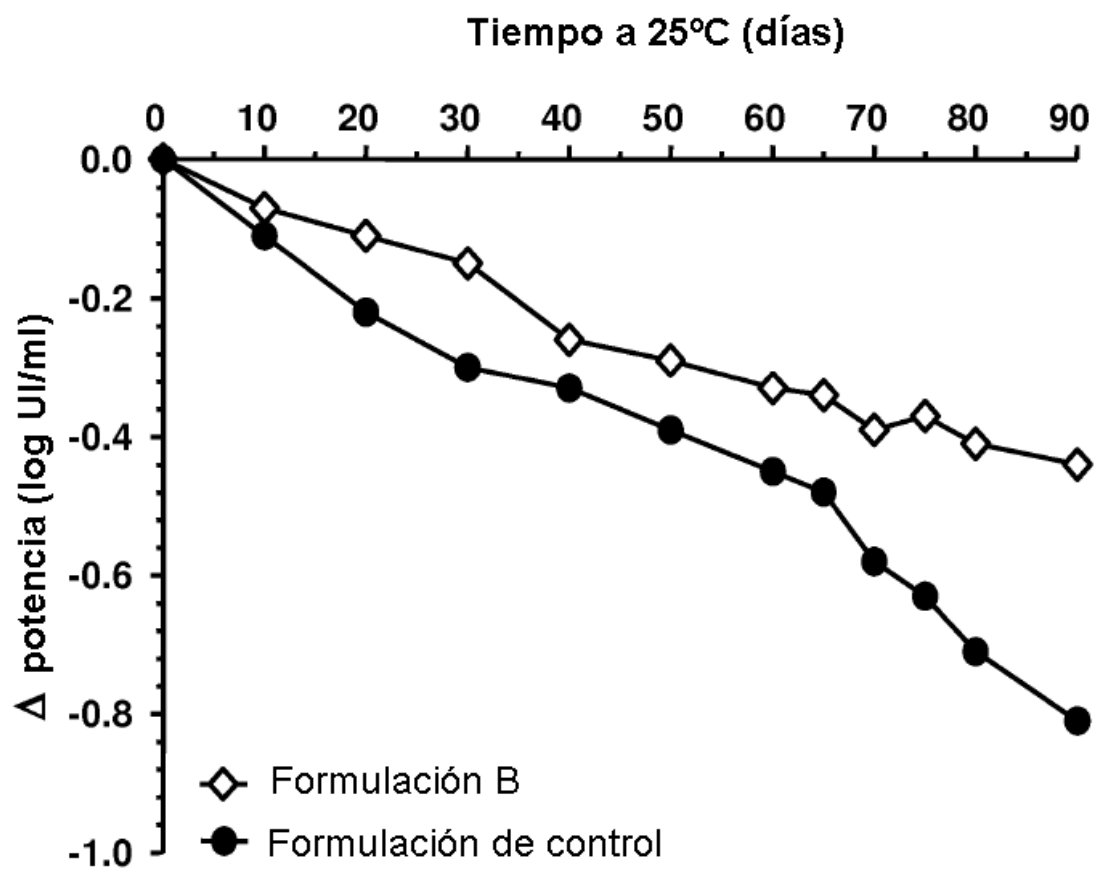
Peterson J.J., Journal of Biopharmaceutical Statistics, 18:959–975, 2008.

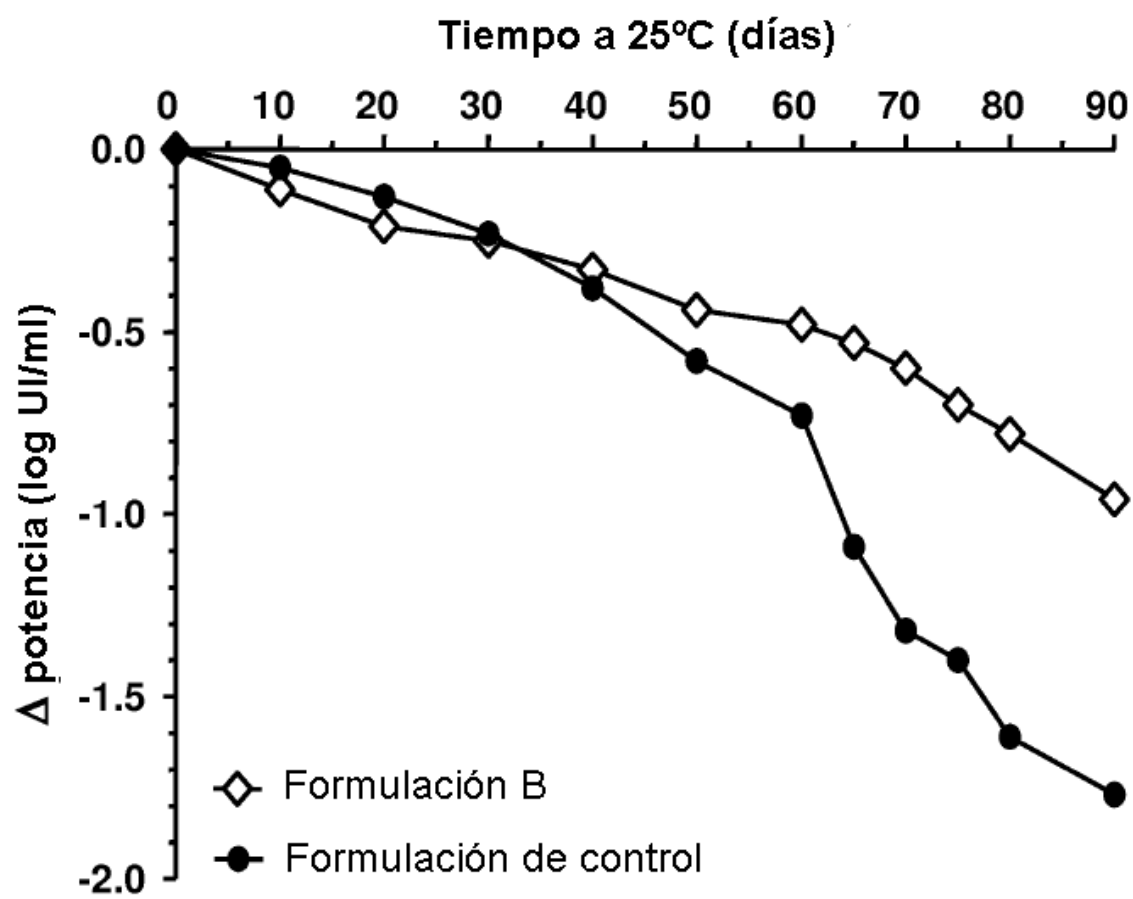
Radosevic K, Rodriguez A, Lemckert AA, van der Meer M, Gillissen G, Warnar C, von Eyben R, Pau MG, Goudsmit J. The Th1 immune response to Plasmodium falciparum circumsporozoite protein is boosted by adenovirus vectors 35 and 26 with a homologous insert. Clin Vaccine Immunol. 2010 Nov;17(11):1687-94.

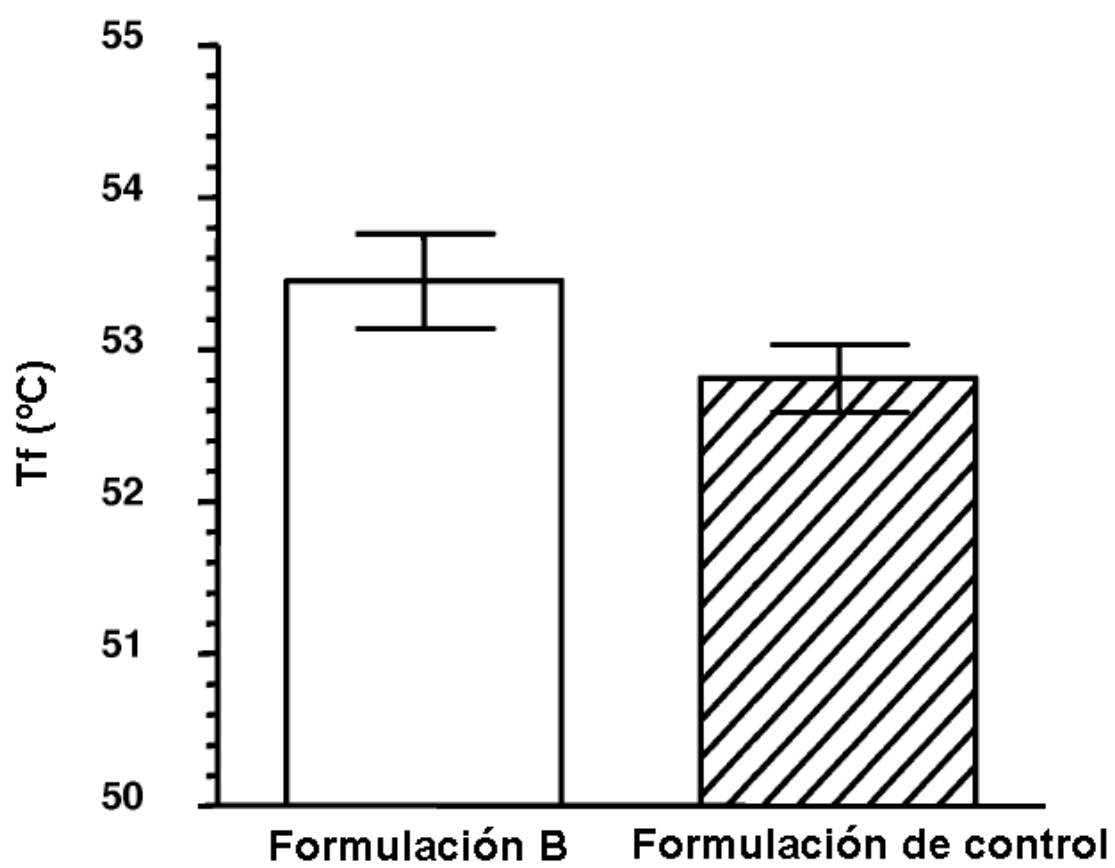
Renteria S S et al. "Development of a nasal adenovirus-based vaccine: Effect of concentration and formulation on adenovirus stability and infectious titer during actuation from two delivery devices" Vaccine, vol. 28, no.9, 25 de febrero de 2010.

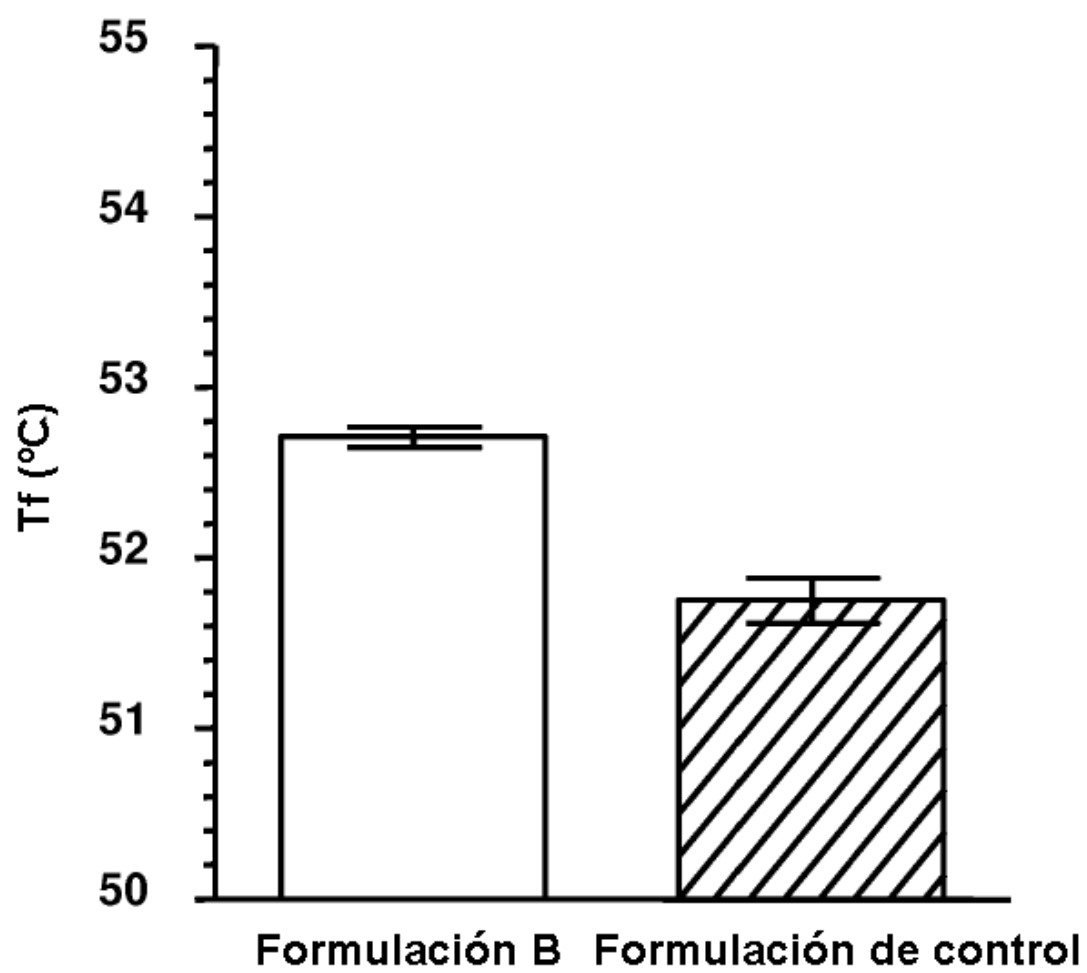
REIVINDICACIONES

1. Formulaci3n l3quida para adenovirus, que comprende:
 - a) un adenovirus recombinante;
 - b) un tamp3n citrato;
 - 5 c) hidroxipropil-beta-ciclodextrina (HBCD);
 - d) una sal;
 - e) un detergente no i3nico;
 en la que dicha formulaci3n tiene un pH que oscila entre 5.5 y 6.5.
2. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1, en la que la concentraci3n de citrato oscila entre 5 mM y 30 mM.
- 10 3. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 1 3 2, en la que la concentraci3n de HBCD oscila entre el 1% (p/p) y el 10% (p/p).
4. Formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la sal es cloruro de sodio.
5. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 4, en la que la concentraci3n de cloruro de sodio oscila entre 20 mM y aproximadamente 200 mM.
6. Formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en la que el detergente no i3nico es polisorbato 80.
- 15 7. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 6, en la que la concentraci3n de polisorbato 80 oscila entre el 0.005% (p/p) y el 0.5% (p/p).
8. Formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en la que dicha formulaci3n tiene un pH que oscila entre 5.7 y 6.3, y comprende citrato a una concentraci3n que oscila entre 5 y 30 mM; HBCD a una concentraci3n que oscila entre el 1% (p/p) y el 10% (p/p); NaCl a una concentraci3n que oscila entre 20 mM y 200 mM; polisorbato 80 a una concentraci3n que oscila entre el 0.01% (p/p) y el 0.05% (p/p).
- 20 9. Formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que dicha formulaci3n comprende adem3s un alcohol de 2 3 4 carbonos.
10. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 9, en la que el alcohol de 2 3 4 carbonos es etanol.
11. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 10, en la que la concentraci3n de etanol oscila entre el 0.1% (p/p) y el 1% (p/p).
- 25 12. Formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 9-11, en la que dicha formulaci3n tiene un pH que oscila entre 5.7 y 6.3, y comprende citrato a una concentraci3n que oscila entre 5 y 30 mM; HBCD a una concentraci3n que oscila entre el 1% (p/p) y el 10% (p/p); NaCl a una concentraci3n que oscila entre 20 mM y 200 mM; polisorbato 80 a una concentraci3n que oscila entre el 0.01% (p/p) y el 0.05% (p/p) y etanol a una concentraci3n que oscila entre el 0.2% (p/p) y el 0.6% (p/p).
- 30 13. Formulaci3n seg3n la reivindicaci3n 12, en la que dicha formulaci3n tiene un pH que oscila de 6, y comprende citrato a una concentraci3n de 20 mM; HBCD a una concentraci3n del 5% (p/p); NaCl a una concentraci3n de 80 mM; polisorbato 80 a una concentraci3n que oscila del 0.025% (p/p) y etanol a una concentraci3n del 0.4% (p/p).
14. Formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 10-12, en la que dicha formulaci3n tiene un pH que oscila entre 5.9 y 6.2, y comprende citrato a una concentraci3n que oscila entre 10 y 25 mM; HBCD a una concentraci3n que oscila entre el 4% (p/p) y el 6% (p/p); NaCl a una concentraci3n que oscila entre 70 mM y 100 mM; polisorbato 80 a una concentraci3n que oscila entre el 0.018% (p/p) y el 0.035% (p/p) y etanol a una concentraci3n que oscila entre el 0.3% (p/p) y el 0.45% (p/p).
- 35 15. Formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en la que dicha formulaci3n es adecuada para uso parenteral.
- 40 16. M3todo de conservaci3n de un adenovirus que comprende preparar una formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-15.
17. M3todo de conservaci3n de un adenovirus que comprende preparar una formulaci3n seg3n una cualquiera de las reivindicaciones 1-15 y almacenar dicha formulaci3n a una temperatura que oscila entre 2°C y 8°C.

**Fig. 1**

**Fig. 2**

**Fig. 3**

**Fig. 4**

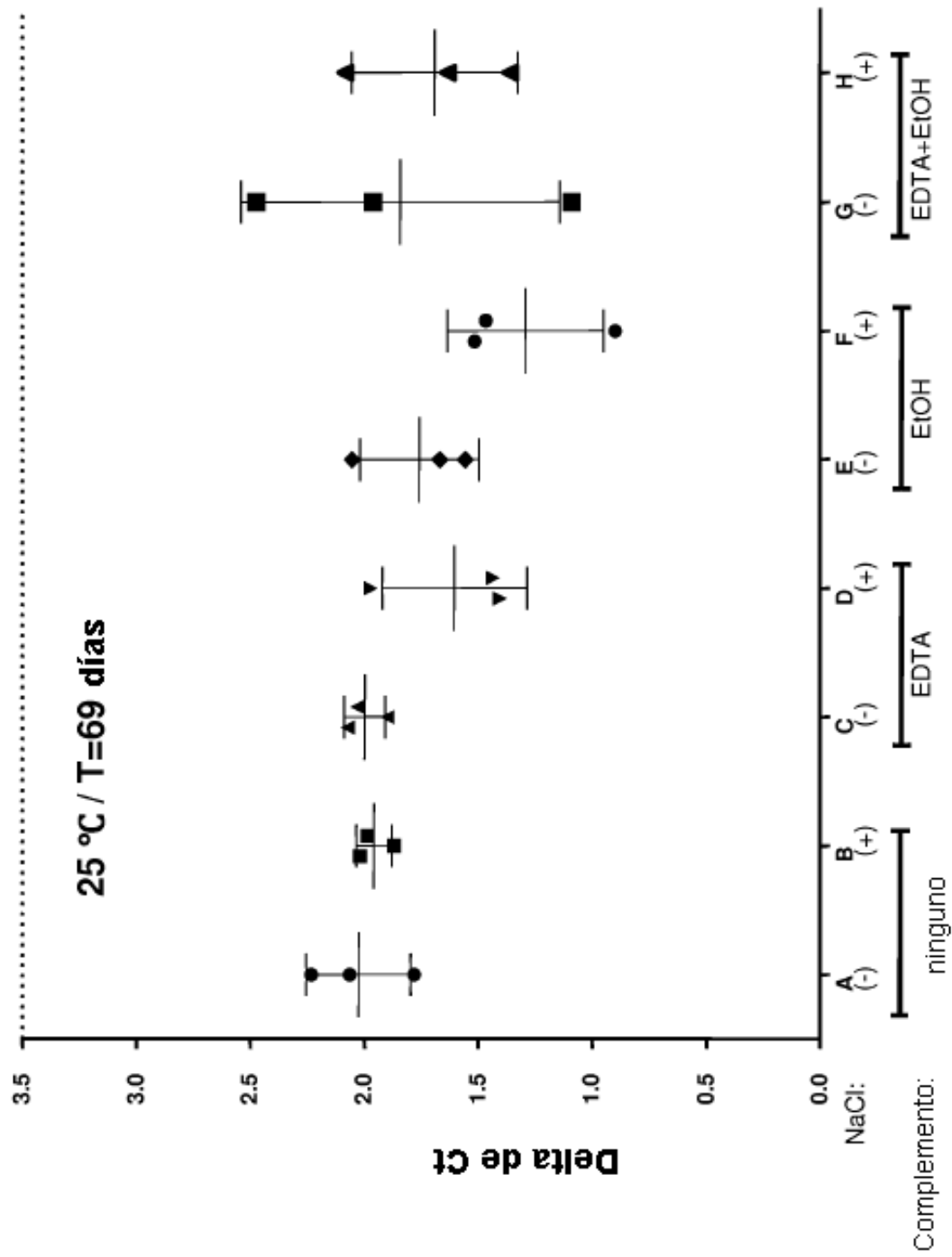


Fig. 5

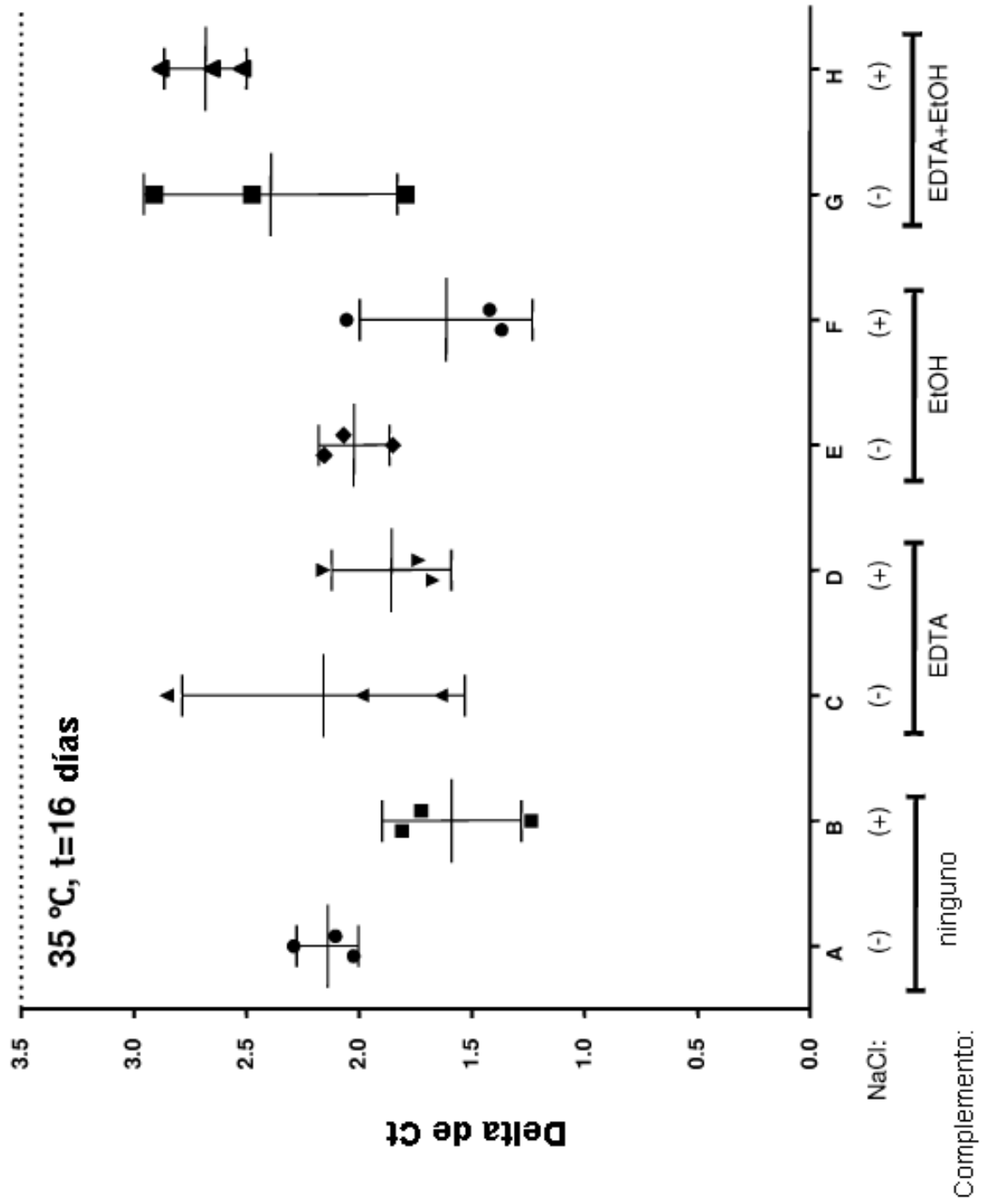


Fig. 6

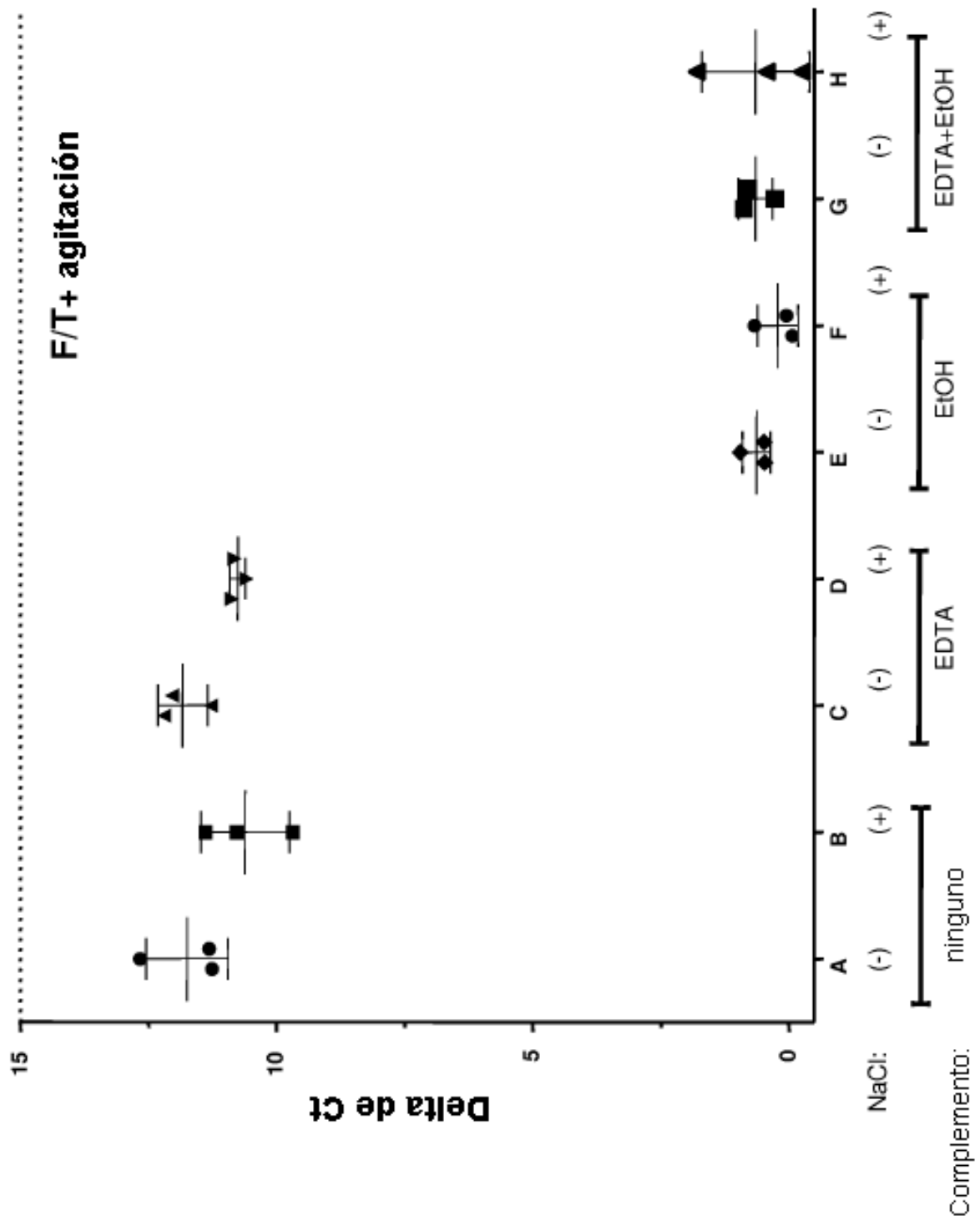
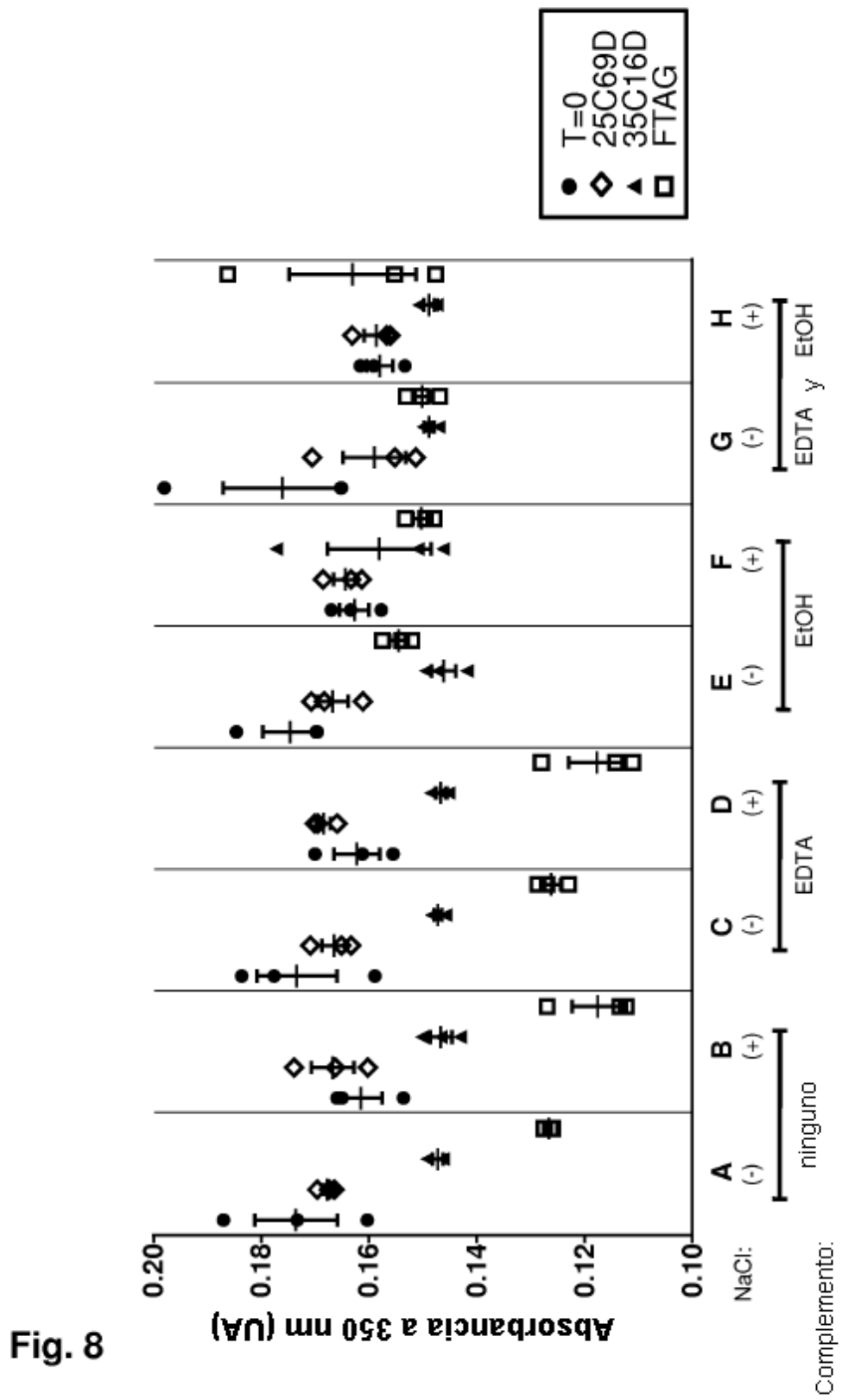
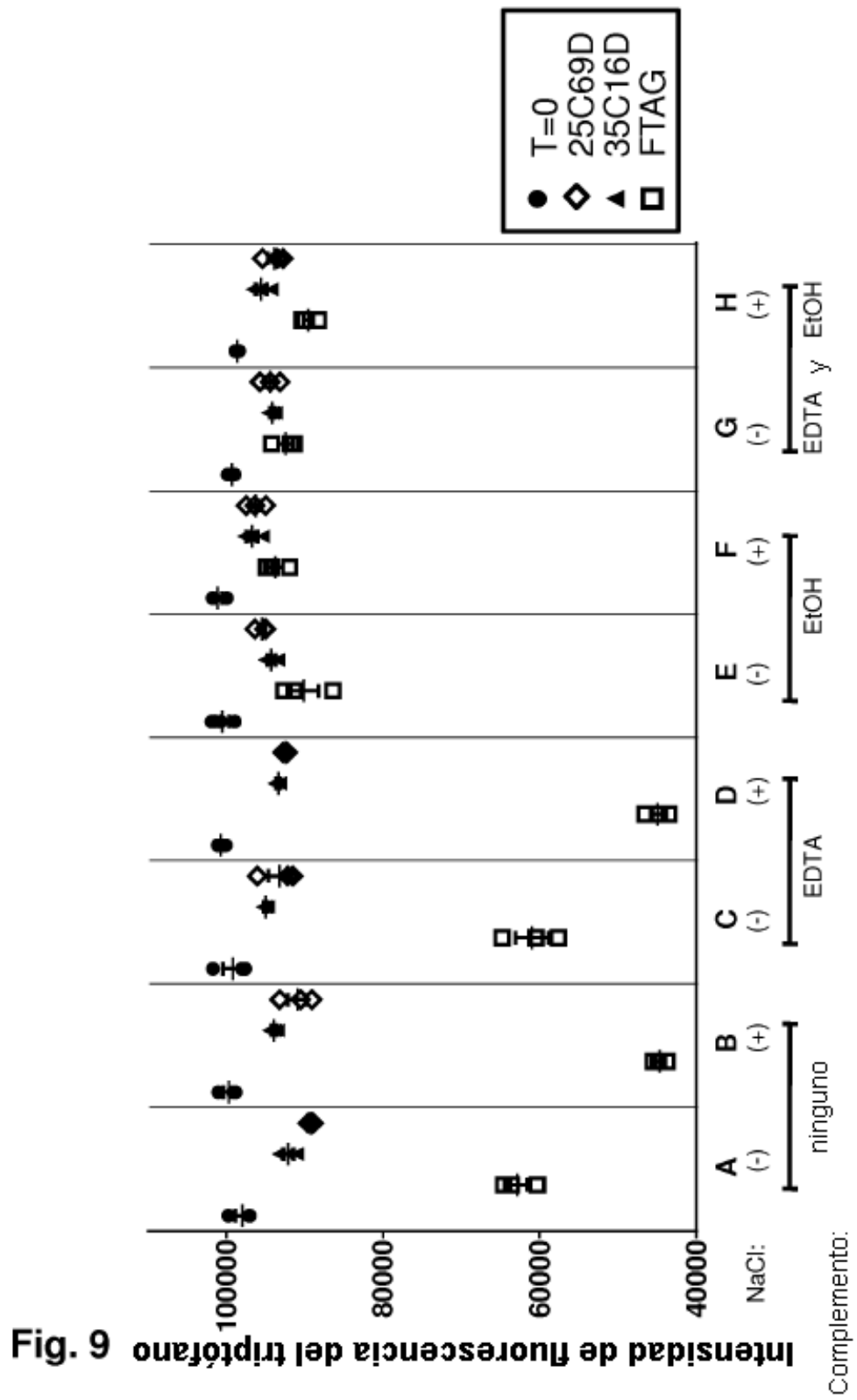


Fig. 7





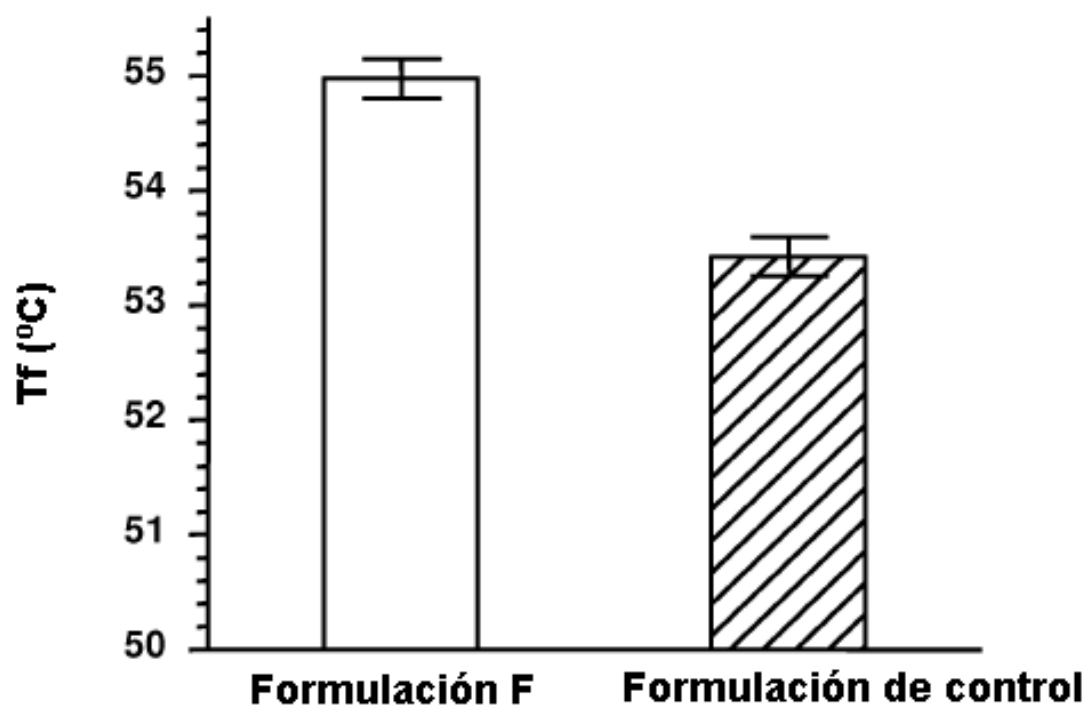


Fig. 10

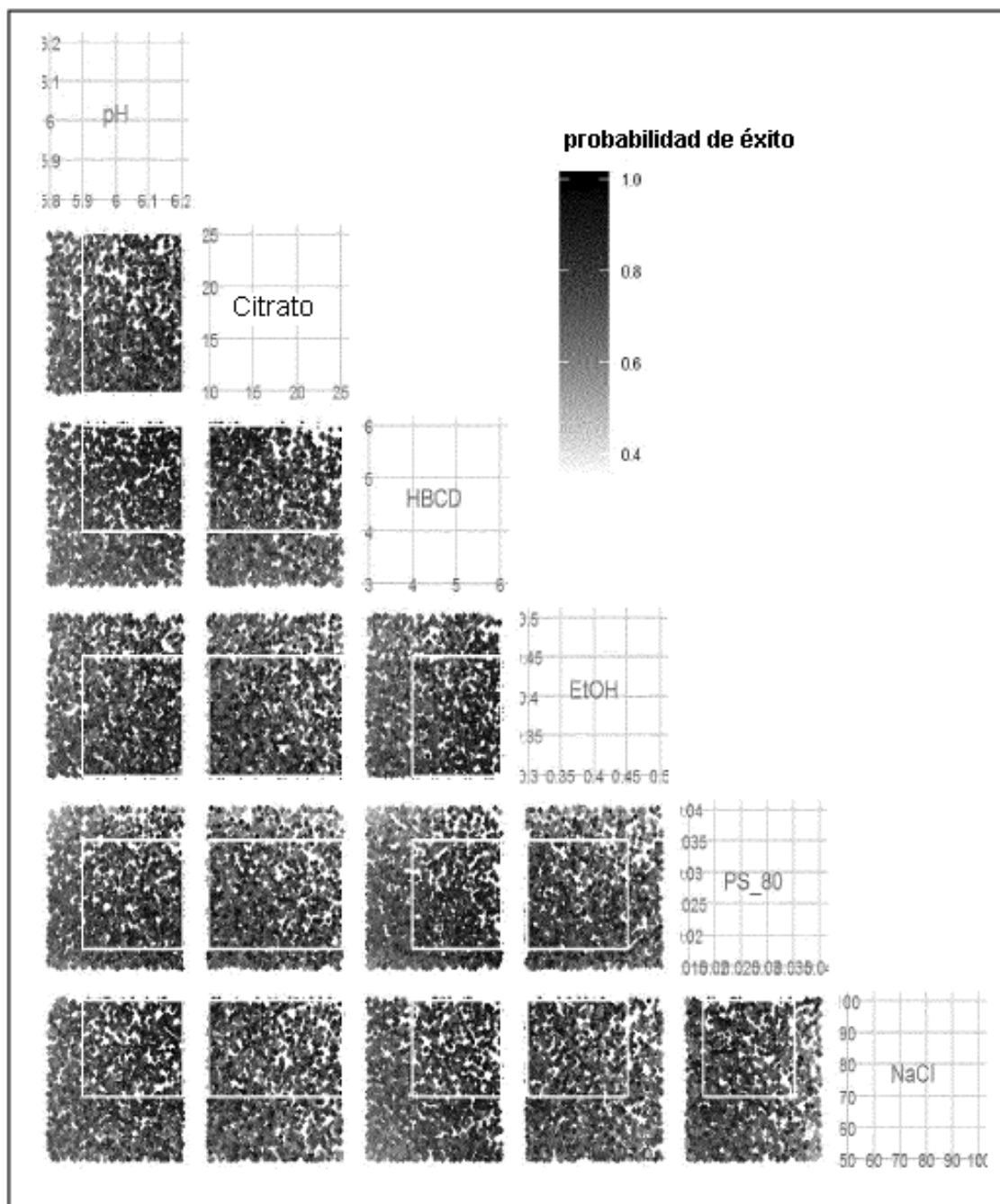


Fig. 11