

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(21) **201890876** (13) **A1**

(12) **ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ**

(43) Дата публикации заявки
2018.08.31

(51) Int. Cl. *A61K 9/08* (2006.01)
A61K 47/40 (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01)

(22) Дата подачи заявки
2016.10.06

(54) **СПОСОБЫ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ РАЗРУШЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ,
ВЫЗВАННОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ С ПЛАСТИКОМ**

(31) **15188486.3**

(32) **2015.10.06**

(33) **EP**

(86) **PCT/EP2016/073838**

(87) **WO 2017/060329 2017.04.13**

(71) Заявитель:

**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:

**Адриансен Яник, Хесселинк Ренске
Виллемейн (NL)**

(74) Представитель:

Медведев В.Н. (RU)

(57) Настоящее изобретение относится к способам обеспечения защиты вируса, содержащегося в биотехнологическом мешке, от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, вследствие чего улучшается совместимость вирусов с этими разновидностями пластика за счет сохранения количества и эффективности вирусов, содержащихся в биотехнологических мешках, в ходе хранения в течение определенного периода времени. В данном документе было показано, что вирусы могут быстро разрушаться при хранении в биотехнологических мешках и что добавление β -циклодекстрина к раствору, содержащему вирус, который хранится в биотехнологическом мешке, неожиданно предотвращает разрушение указанного вируса, вызванное взаимодействием с пластиковой поверхностью.

201890876
A1

201890876

A1

**СПОСОБЫ ПРЕДОТВРАЩЕНИЯ РАЗРУШЕНИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ,
ВЫЗВАННОГО ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ С ПЛАСТИКОМ**

ОБЛАСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Настоящее изобретение относится к способам предотвращения разрушения биологических препаратов, вызванного взаимодействием с поверхностью, в биотехнологических мешках. В частности, оно относится к применению β -циклодекстринов для предотвращения ухудшения состояния вирусов в растворах, содержащихся в биотехнологических мешках. Благодаря способам по настоящему изобретению улучшается совместимость указанных вирусов с пластиковыми биотехнологическими мешками за счет сохранения количества, структуры, эффективности и качества содержащихся в них вирусов.

ПРЕДПОСЫЛКИ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Учитывая четкую тенденцию к применению в фармацевтической промышленности одноразовых систем, существующей задачей в области, связанной с вирусами, является создание способов изготовления и хранения в балк-форме жидких композиций, содержащих указанные вирусы. В особенности, когда указанные вирусы стабилизированы для более длительных периодов времени в пределах диапазона температур хранения, приемлемого для фармацевтических продуктов, как, например, от приблизительно 2°C до приблизительно 8°C. По практическим и логическим соображениям для хранения вирусов часто применяют биотехнологические мешки, которые представляют собой пластиковые контейнеры. Состояние указанных крупных структур часто ухудшается внутри этих пластиковых контейнеров вследствие механизмов, которые в значительной степени не изучены.

Биологическая активность вируса зависит от конформационной целостности по меньшей мере коровой последовательности аминокислот. В отличие от традиционных органических и неорганических малых молекул, вирусы представляют собой весьма сложные биологические структуры, и незначительные химические или

физические стресс-факторы могут способствовать разрушению вируса. Совместимая первичная упаковка для хранения в балк-форме имеет существенное значение для обеспечения приемлемого срока хранения, но с учетом природы одноразовых контейнеров для хранения, применяемых в данной промышленности, это создает определенные проблемы. Вирусы, содержащиеся в биотехнологическом мешке, склонны к потере эффективности в результате разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью.

Соответственно, в данной области техники существует необходимость в изыскании способов улучшения совместимости вирусов с биотехнологическими мешками, которые применяют для изготовления и хранения вирусов. В частности, существует необходимость в способах, которые обеспечивают защиту вирусов, содержащихся в биотехнологических мешках, от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, и благодаря которым улучшается срок хранения указанных вирусов в ходе обработки и хранения в балк-форме.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Авторы настоящего изобретения изыскали и описали в данном документе способы обеспечения защиты вируса, содержащегося в биотехнологическом мешке, от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью. Благодаря этим способам улучшается совместимость вирусов с пластиковыми биотехнологическими мешками за счет сохранения количества, структуры, эффективности и качества вируса в отличие от ранее раскрытых способов. Примечательно, что добавление β -циклодекстрина к любому раствору, содержащему вирусы, содержащемуся в биотехнологическом мешке, приводит в результате к исключительному сохранению структуры и эффективности указанных вирусов, благодаря чему неожиданно улучшается общая совместимость указанных вирусов с пластиковой поверхностью контейнера для хранения в балк-форме по сравнению с тем же раствором без β -циклодекстрина.

Таким образом, настоящее изобретение относится к способам обеспечения защиты вируса от разрушения, вызванного

взаимодействием с поверхностью, где указанный вирус содержится в растворе, находящемся в мешке, состоящем из пластика, и где указанный способ включает стадию добавления β -циклодекстрина к указанному раствору в концентрации от приблизительно 1% (вес/вес) до приблизительно 30% (вес/вес). В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный циклодекстрин представляет собой β -циклодекстрин, выбранный из группы диметил- β -циклодекстрина, 2-гидроксиэтил- β -циклодекстрина, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина, 3-гидроксипропил- β -циклодекстрина и триметил- β -циклодекстрина. В еще более предпочтительном варианте осуществления указанный β -циклодекстрин представляет собой 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин.

В более предпочтительном варианте осуществления в соответствии с настоящим изобретением слой из пластика, контактирующий с жидкостью, выбран из группы этиленвинилацетата, полиэтилена, полиамида и полиэтилена. Более предпочтительно указанный слой представляет собой этиленвинилацетат. В определенных вариантах осуществления указанный пластик предусматривает газонепроницаемый барьер. Предпочтительно указанный газонепроницаемый барьер изготовлен из этилвинилового спирта. В предпочтительном варианте осуществления в соответствии с настоящим изобретением указанный мешок представляет собой биотехнологический мешок. В другом предпочтительном варианте осуществления в соответствии с настоящим изобретением указанный вирус представляет собой аденовирус.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу обеспечения защиты аденовируса от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, где указанный аденовирус содержится в растворе, находящемся в мешке, состоящем из пластика, и где указанный способ включает стадию добавления β -циклодекстрина к указанному раствору в концентрации от приблизительно 1% (вес/вес) до приблизительно 30% (вес/вес). Предпочтительно указанный мешок имеет слой, контактирующий с жидкостью, состоящий из этиленвинилацетата. Более

предпочтительно указанный β -циклодекстрин представляет собой 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин.

В более предпочтительном варианте осуществления настоящее изобретение относится к способу обеспечения защиты аденовируса от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, где указанный аденовирус содержится в растворе, находящемся в мешке, состоящем из этиленвинилацетата, и где указанный способ включает стадию добавления 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина к указанному раствору в концентрации от приблизительно 1% (вес/вес) до приблизительно 30% (вес/вес).

В данном документе впервые было продемонстрировано, что добавление β -циклодекстрина может обеспечить защиту от разрушения вируса, вызванного взаимодействием с поверхностью, при хранении в биотехнологическом мешке. Таким образом, настоящее изобретение также относится к применению β -циклодекстрина для обеспечения защиты вируса от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, где указанный вирус содержится в растворе, который содержится в пластиковом биотехнологическом мешке.

Предпочтительно указанный β -циклодекстрин выбран из группы диметил- β -циклодекстрина, 2-гидроксиэтил- β -циклодекстрина, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина, 3-гидроксипропил- β -циклодекстрина и триметил- β -циклодекстрина. В еще более предпочтительном варианте осуществления указанный β -циклодекстрин представляет собой 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин.

В более предпочтительном варианте осуществления в соответствии с настоящим изобретением пластик является полимером. Предпочтительно указанный пластик выбран из группы этиленвинилацетата, полиэтилена, полиамида и полиэтилена. В определенных вариантах осуществления указанный пластик предусматривает газонепроницаемый барьер. Предпочтительно указанным газонепроницаемым барьером является этилвиниловый спирт.

В другом предпочтительном варианте осуществления в соответствии с настоящим изобретением указанный вирус представляет собой аденовирус.

Настоящее изобретение также относится к применению 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина для обеспечения защиты аденовируса от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, где указанный аденовирус содержится в растворе, который содержится в биотехнологическом мешке.

Настоящее изобретение также относится к применению 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина для обеспечения защиты аденовируса от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, где указанный аденовирус содержится в растворе, который содержится в биотехнологическом мешке из этиленвинилацетата.

ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

Фигура 1. Совместимость Ad26 в составе 1 с пластиковыми мешками Flexboy (закрашенные круги и непрерывные линии) или стеклянными флаконами (пустые ромбики и пунктирные линии) при хранении при 5°C (слева) или 25°C (справа) в течение четырех недель включительно, которую контролировали по собственной флуоресценции белков. Показаны средние значения и стандартные отклонения, при этом линиями обозначены линии тренда.

Фигура 2. Совместимость Ad26 в составе 1 с пластиковыми мешками Flexboy (закрашенные круги и непрерывные линии) или стеклянными флаконами (пустые ромбики и пунктирные линии) при хранении при 5°C (слева) или 25°C (справа) в течение четырех недель включительно, которую контролировали по содержанию гексона с помощью RP-UPLC. Показаны средние значения и стандартные отклонения, при этом линиями обозначены линии тренда.

Фигура 3. Совместимость Ad26 в составе 1 с пластиковыми мешками Flexboy (закрашенные круги и непрерывные линии) или стеклянными флаконами (пустые ромбики и пунктирные линии) при хранении при 5°C (слева) или 25°C (справа) в течение четырех недель включительно, которую контролировали по концентрации

белка с помощью поглощения при 280 нм. Показаны средние значения и стандартные отклонения, при этом линиями обозначены линии тренда.

Фигура 4. Совместимость Ad26 в составе 1 с пластиковыми мешками Flexboy (закрашенные круги и непрерывные линии) или стеклянными флаконами (пустые ромбики и пунктирные линии) при хранении при 5°C (слева) или 25°C (справа) в течение четырех недель включительно, которую контролировали по титру аденовируса с помощью *vp-QPCR*. Показаны средние значения и стандартные отклонения, при этом линиями обозначены линии тренда.

Фигура 5. Совместимость Ad26 в составе 1 с пластиковыми мешками Flexboy (закрашенные круги и непрерывные линии) или стеклянными флаконами (пустые ромбики и пунктирные линии) при хранении при 5°C (слева) или 25°C (справа) в течение четырех недель включительно, которую контролировали по концентрации аденовируса с помощью *AEX-UPLC*. Показаны средние значения и стандартные отклонения, при этом линиями обозначены линии тренда.

Фигура 6. Совместимость Ad26 в составе 1 с пластиковыми мешками Flexboy (закрашенные круги и непрерывные линии) или стеклянными флаконами (пустые ромбики и пунктирные линии) при хранении при 5°C (слева) или 25°C (справа) в течение четырех недель включительно, которую контролировали по эффективности с помощью *QPA*. Показаны средние значения и стандартные отклонения, при этом линиями обозначены линии тренда.

Фигура 7. Совместимость Ad26 в составе 1 с пластиковыми мешками Flexboy (закрашенные круги) или стеклянными флаконами (пустые ромбики) в течение одного цикла замораживания/размораживания (от комнатной температуры до -70°C и обратно при 0,032°C/мин), которую контролировали по собственной флуоресценции белков (А) и содержанию гексона с помощью *RP-UPLC* (В). Показаны средние значения и стандартные отклонения.

Фигура 8. Совместимость Ad26 в составе 1 с (слева направо) биотехнологическими мешками Flexboy® (Sartorius Stedim Biotech GmbH), биотехнологическими мешками HyQ Cx5-14 (Thermo Fisher),

биотехнологическими мешками PureFlex Mobius (Millipore) или стеклянными флаконами (Nuova Ompi). Составы хранили при 5°C (закрашенные квадраты) или 25°C (пустые треугольники) в течение 24 недель включительно, и совместимость контролировали по эффективности с помощью QPA. Показаны средние значения и стандартные отклонения с линейной аппроксимацией данных, при этом 95% доверительные интервалы заштрихованы серым цветом.

Фигура 9. Совместимость Ad26 в составах 1, 2 и 3 (слева направо) без HBCD (пустые круги и пунктирные линии) либо дополненных 5% (вес/вес) HBCD (кресты и сплошные линии) с пластиковыми мешками Flexboy в ходе хранения при 25°C в течение одной недели включительно, которую контролировали по собственной флуоресценции белков. Показаны средние значения и стандартные отклонения, при этом линиями обозначены линии тренда.

Фигура 10. Совместимость Ad26 в составах 1, 2 и 3 (слева направо) без HBCD (пустые круги и пунктирные линии) либо дополненных 5% (вес/вес) HBCD (кресты и сплошные линии) с биотехнологическими мешками в ходе хранения при 25°C в течение одной недели включительно, которую контролировали по содержанию гексона с помощью RP-UPLC. Показаны средние значения и стандартные отклонения, при этом линиями обозначены линии тренда.

Фигура 11. Совместимость Ad26 в составах 1 и 2 (слева направо) без HBCD (пустые круги и пунктирная линия) либо дополненных 5% (вес/вес) HBCD (кресты и сплошная линия) с биотехнологическими мешками в ходе хранения при 25°C в течение одной недели включительно, которую контролировали по концентрации аденовирусных частиц с помощью SE. Линии показывают линейную аппроксимацию данных, при этом 95% доверительные интервалы заштрихованы серым цветом. После приведения в контакт с биотехнологическим мешком в составе 3 без HBCD происходило разрушение до такой степени, что нельзя было определить концентрацию вирусных частиц.

Фигура 12. Совместимость Ad26 в составе 2, дополненном 0, 0,2, 1 или 5% (вес/вес) HBCD, с пластиковыми мешками Flexboy

после хранения в течение 8 дней при 25°C, которую контролировали по собственной флуоресценции белков. Показаны отдельные измерительные точки, при этом линией обозначена линия тренда.

Фигура 13. Совместимость Ad26 в составе 2, дополненном 0, 0,2, 1 или 5% (вес/вес) HBCD, с пластиковыми мешками Flexboy после хранения в течение 8 дней при 25°C, которую контролировали по концентрации белка с помощью поглощения при 280 нм. Показаны отдельные измерительные точки, при этом линией обозначена линия тренда.

Фигура 14. Совместимость Ad26 в составе 2, дополненном 0, 0,2, 1 или 5% (вес/вес) HBCD, с пластиковыми мешками Flexboy после хранения в течение 8 дней при 25°C, которую контролировали по содержанию гексона с помощью RP-UPLC. Показаны отдельные измерительные точки, при этом линией обозначена линия тренда.

Фигура 15. Совместимость Ad26 в составе 2, дополненном 0, 0,2, 1 или 5% (вес/вес) HBCD, с пластиковыми мешками Flexboy после хранения в течение 8 дней при 25°C, которую контролировали по концентрации аденовирусных частиц с помощью СЕ. Линия показывает линейную аппроксимацию данных, при этом 95% доверительный интервал заштрихован серым цветом.

Фигура 16. Совместимость Ad26 в составе 2, дополненном 0, 0,2, 1 или 5% (вес/вес) HBCD, с пластиковыми мешками Flexboy после хранения в течение 8 дней при 25°C, которую контролировали по эффективности с помощью QPA. Линия показывает линейную аппроксимацию данных, при этом 95% доверительный интервал заштрихован серым цветом.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ

Как упоминалось ранее, существует необходимость в изыскании способов обеспечения защиты вируса, содержащегося в биотехнологическом мешке, от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, вследствие чего улучшать совместимость вирусов с технологическими и предназначенными для хранения в форме-балк материалами за счет сохранения количества и эффективности содержащихся в них вирусов. В данном документе было показано, что вирусы быстро разрушаются в

биотехнологических мешках, и что добавление β -циклодекстрина, такого как 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин (все молярные замещения, HBCD), к вирусу в растворе, хранящемся в биотехнологическом мешке, неожиданным образом предотвращает разрушение указанного вируса, вызванное взаимодействием с пластиковой поверхностью.

Авторы настоящего изобретения изыскали и описали в данном документе способы обеспечения сохранения вирусов в биотехнологических мешках. В частности, эти способы обеспечивают защиту вирусов от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, если указанные вирусы содержатся в растворе, находящемся в мешке, состоящем из пластика. Благодаря этим способам улучшается биологическая совместимость с разновидностями пластика за счет сохранения количества, эффективности и качества вируса, в отличие от ранее раскрытых способов, независимо от применяемой основы состава. Примерами вирусов, для которых подходят способы по настоящему изобретению, являются без ограничения (активные) вирусы, вакцины, вирусы, не имеющие оболочки, вирусы с оболочкой, вирусоподобные частицы, рекомбинантные вирусы, а также инактивированные и аттенуированные вирусы.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения вирус представляет собой рекомбинантный аденовирус. Конструирование и размножение аденовирусных векторов хорошо известно из уровня техники и включает применение стандартных методик молекулярной биологии, таких как описанные, например, в Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2d ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson et al., *Recombinant DNA*, 2d ed., Scientific American Books (1992), патенте США № 6492169 или в публикации WO 03/104467, патентах США №№ 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, WO 96/26281, WO 00/03029 и Thomas Shenk "Adenoviridae and their Replication", которые включены в данный документ посредством ссылки. В определенных вариантах осуществления настоящего изобретения

серотипы аденовируса человека включают любой из серотипов 2, 4, 5, 7, 11, 26, 34, 35, 36, 48, 49 или 50 или любой гибридный или мутантный серотип аденовируса. В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения рекомбинантный аденовирус относится к серотипу 5, 26 или 35 аденовируса человека. В дополнительных вариантах осуществления аденовирус по настоящему изобретению представляет собой обезьяний аденовирус, предпочтительно аденовирус шимпанзе или гориллы. Эти аденовирусы обычно характеризуются низким доминированием серотипа и/или низкими титрами предсуществующих нейтрализующих антител в популяции человека. В дополнительных вариантах осуществления аденовирус по настоящему изобретению дополнительно содержит гетерологичную нуклеиновую кислоту. Подходящая гетерологичная нуклеиновая кислота хорошо известна специалисту в данной области и может включать, например, открытые рамки считывания трансонов, например, открытые рамки считывания, кодирующие полипептиды, иммунный ответ на которые является желаемым, если вектор используется в целях вакцинации, например, трансоны, подходящие для формирования иммунного ответа на возбудителей малярии (см., например, WO 2004/055187), HIV, вируса Эбола, RSV, HPV, вируса Зика, HSV, на возбудителей туберкулеза (см., например, WO 2006/053871), на определенные вирусы и т. п., все из которых хорошо известны специалисту в данной области. В действительности природа трансона не является критически важной для настоящего изобретения, при этом он может представлять собой любую гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты и, следовательно, в данном случае не нуждается в дополнительном усовершенствовании. Несколько ссылок раскрывают применение циклодекстринов в качестве вспомогательного вещества для составления аденовирусов. В WO029024 раскрыт гидроксипропил- β -циклодекстрин, являющийся частью большого перечня возможных лиопротекторов, применяемых для получения лиофилизированного состава. WO029024 относится к лиофилизированной композиции в противоположность жидкой композиции, раскрытой в настоящем изобретении. Преимущество жидкого состава заключается в том, что

он является менее дорогостоящим, и его обработка перед введением является менее времязатратной и в меньшей степени подверженной клиническим ошибкам дозирования и восстановления. Кроме того, увеличение масштаба способов лиофилизации может быть громоздкой попыткой. Renteria и соавт. определяют НВСД как одну из добавок, применяемых для содействия стабильности некоторых белков и во избежание агрегации при назальном введении. Renteria и соавт. раскрывают применение гидроксипропил- β -циклодекстрина, усиливающего поглощение слизистой оболочкой, в аспекте состава, подходящего для назального введения. В WO2015/04002 раскрыты сложные многокомпонентные вирусосодержащие композиции, содержащие НВСД в качестве одного из компонентов. Все из вирусосодержащих композиций, которые содержат НВСД и которые проиллюстрированы в WO2015/04002, содержатся в стеклянных флаконах. В WO2015/04002 не упоминается о несовместимости аденовирусов с пластиковыми биотехнологическими мешками.

НВСД обычно применяют для увеличения растворимости малых молекул (например, диклофенака или ибупрофена). Это связано с его необычной структурой. Молекула НВСД представляет собой торообразное кольцо с полярной гидрофильной наружной частью и неполярной гидрофобной полостью из-за пространственного распределения ее внешних гидрофильных свойств. Вторичные ОН-группы находятся на противоположном краю. Эти гидроксильные группы придают НВСД его внешние гидрофильные свойства. Внутренняя часть кольца НВСД мала по диаметру (намного меньше, чем вирусная частица) и подходит только для малых молекул. Она состоит из поверхности гидрофобных атомов водорода, а также гликозидного эфироподобного атома кислорода. Вследствие этой характерной структуры НВСД применяется для инкапсуляции или захвата очень малых молекул, солюбилизировав их с образованием так называемых соединений включения. Эти структурные особенности НВСД не делают НВСД очевидным выбором для применения в решении проблем несовместимости с биотехнологическими мешками.

Термин "совместимость" относится к способности двух материалов или компонентов существовать, будучи в контакте или

рядом друг с другом, не влияя отрицательно на такие характеристики, как количество, структура, эффективность или качество одного или обоих компонентов. В контексте данного документа он относится к относительной стойкости к разрушению вирусных частиц, находящихся в контакте или рядом с поверхностью биотехнологического мешка или другого упаковочного материала.

Термин "эффективность" в контексте данного документа относится к мере активности аденовируса, выраженной в инфекционных единицах, измеряемых в клеточном анализе эффективности, который описан далее в данном документе.

Термин "побочный продукт" включает нежелательные продукты, которые уменьшают или снижают долю аденовируса, оказывающего терапевтический/профилактический эффект, в данном составе. Типичные побочные продукты включают агрегаты аденовируса и фрагменты аденовируса, образующиеся в результате, например, денатурации, дезамидирования, гидролиза белков или их комбинаций. Обычно агрегаты представляют собой комплексы, имеющие молекулярную массу, большую, чем таковая у выделенной вирусной частицы.

Способ, который обеспечивает защиту вируса от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, как используется в данном документе, и за счет которого улучшается совместимость с разновидностями пластика, представляет собой способ, который обеспечивает сохранение физической и/или химической целостности и/или биологической активности вируса при хранении в биотехнологическом мешке. Это можно оценить путем определения различных характеристик, таких как эффективность и/или другие аспекты качества вируса, находящегося в биотехнологических мешках, в течение определенного периода времени и при определенных условиях хранения. Эти характеристики указанного вируса можно измерить при повышенных температурах (предсказательных для температур в реальном времени) или в других условиях стресса, например, вирусы можно подвергать инкубации при 25°C для изучения эффектов различных условий, максимально увеличивающих биологический срок хранения. Указанные

характеристики, определяющие разрушение вирусов, можно определить с помощью по меньшей мере одного из способов, выбранных из группы, состоящей из визуального осмотра, количественной полимеразной цепной реакции вирусных частиц (vr-QPCR), анализа эффективности на основе QPCR (QPA), обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC), АЕХ-УPLC, анализа собственной флуоресценции и концентрации белка с помощью поглощения при 280 нм.

Количественная полимеразная цепная реакция вирусных частиц (vr-QPCR)

Vr-QPCR проводили для количественной оценки аденовирусных частиц с использованием праймеров, направленных на участок из 100 п.о. промотора CMV кассеты трансгена, присутствующей в аденовирусном векторе. Вкратце, данный способ QPCR основан на экзонуклеазной активности Taq-полимеразы, обуславливающей разрушение специфичного флуоресцентного зонда, отжигаемого в середине ампликона из 100 п.о. Зонд ковалентно связан со светоизлучающей молекулой и гасителем, и его разрушение отделяет излучающую молекулу от гасителя с последующим излучением флуоресценции пропорционально количеству матрицы. Количественные значения получают в пороговом цикле (Ct), цикле, в котором усиление сигнала флуоресценции превышает пороговое значение. Пороговое значение для выявления флуоресценции с применением ДНК задают незначительно превышающим фоновый уровень. Количество циклов, при достижении которого флуоресценция превышает пороговое значение, называют пороговым циклом (Ct) или, в соответствии с руководствами MIQE, циклом количественной оценки (Cq) (Bustin et al, 2009). В ходе фазы экспоненциальной амплификации количество копий целевой последовательности ДНК в каждом цикле удваивается. Например, образец ДНК, Ct которого меньше Ct другого образца на 3 цикла, содержит в $2^3=8$ раз больше матрицы. Следовательно, более высокое значение Ct означает более низкое количество целевой ДНК, а более низкое значение Ct означает высокую доступность целевой ДНК. Абсолютную количественную оценку можно проводить путем сравнения с калибровочной кривой, построенной с помощью серийного разведения

исходного раствора аденовируса, концентрация которого была определена по оптической плотности при 260 нм (OD_{260}). Значение C_t тестируемого материала откладывают на графике в зависимости от значений C_t калибровочной кривой, в результате чего получают достоверное и точное количество векторных частиц.

При использовании в качестве регистрируемых показателей после инкубации на E1-компетентных клетках (QPA, см. ниже) более высокие значения дельта- C_t (с вычетом значений в $t=0$) будут происходить из более разрушенных образцов, а более низкие значения C_t будут происходить из более стабилизирующих составов.

Анализ эффективности на основе QPCR (QPA)

Для количественной оценки эффективности аденовируса в QPA сочетается QPCR с анализом инфекционности с использованием культуры тканей. Анализ основан на экспериментальном наблюдении того, что после инокуляции монослоя клеток очень быстро появляется новосинтезированная вирусная ДНК, и она является пропорциональной начальной концентрации вируса в большом диапазоне множественности заражения (MOI). Разведения образцов (не в конечной точке разведения) инокулируют на монослой клеток HEK293 в 96-луночной планшете. Заражению позволяют продолжаться в течение 3 часов при 35°C. Содержимое лунок аспирируют и замещают свежей средой, которая не содержит аденовирусов. Планшеты инкубируют в течение дополнительных 42 часов до осуществления лизиса клеток с помощью раствора Triton X-100 и одной стадии замораживания/размораживания для высвобождения аденовирусной ДНК. QPCR проводят с использованием разбавленных лизатов клеток в соответствии со способом, описанным выше. Титр инфекционности рассчитывают путем сравнения с калибровочной кривой, построенной по значениям C_t образца с известной инфекционностью, определенной путем титрования в конечной точке. Альтернативно, дельта эффективности может быть непосредственно выражена в значениях C_t , поскольку титр инфекционности, или эффективность, напрямую коррелирует со значениями C_t . Это быстрый и надежный способ, особенно для сравнения относительных различий в эффективности между составами.

Обращенно-фазовая ультра высокоэффективная жидкостная хроматография (RP-UPLC)

Чтобы определить несколько характеристик качества аденовируса, таких как присутствие и (относительное) количество аденовирусных и других белков, можно проанализировать профили аденовирусных белков с помощью обращенно-фазовой ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-UPLC).

В UPLC разделяют компоненты смеси с помощью ряда химических взаимодействий между образцом, подвижной фазой (буфером или растворителем) и неподвижной фазой (хроматографическим наполнителем в колонке). Посредством насоса высокого давления подвижная фаза перемещается через колонку, в то время как аналит разделяется между двумя фазами, так что его элюирование зависит от его относительной аффинности к стационарной и подвижной фазам. Детектор измеряет значения времени удерживания (t_R ; время между введением образца и появлением максимума пика) молекул путем выявления, например, поглощения УФ-излучения.

Механизм разделения в RP-UPLC основан на различиях в гидрофобности. В способе профилирования аденовирусных белков неполярная стационарная фаза состоит из гидрофобных алкилов с C4-цепями, тогда как подвижная фаза состоит из смеси вода/ацетонитрил/TFA с увеличивающейся гидрофобностью. Аденовирусные частицы диссоциируют на составляющие их белки, которые изначально взаимодействуют со стационарной фазой и затем элюируются с определенным временем удерживания в зависимости от площади их гидрофобной поверхности. Время удерживания и количество каждого белка контролируют с помощью выявления поглощения УФ-излучения при 280 нм. Типичный профиль аденовируса по RP-UPLC состоит из 10 или 14 белков, включающих коровый белок (VII), пентоновое основание (III) и гексон (II).

Анионообменная ультра высокоэффективная жидкостная хроматография (AEX-UPLC)

Чтобы количественно оценить число аденовирусных частиц можно отделить вирусные частицы от матрицы с помощью анионообменной ультра высокоэффективной жидкостной хроматографии

(АЕХ-УРЛС) и количественно оценить их по поглощению УФ-излучения.

В УРЛС разделяют компоненты смеси с помощью ряда химических взаимодействий между образцом, подвижной фазой (буфером или растворителем) и неподвижной фазой (хроматографическим наполнителем в колонке). Посредством насоса высокого давления подвижная фаза перемещается через колонку, в то время как аналит разделяется между двумя фазами, так что его элюирование зависит от его относительной аффинности к стационарной и подвижной фазам. Детектор измеряет значения времени удерживания (t_R ; время между введением образца и появлением максимума пика) аналитов путем выявления, например, поглощения УФ-излучения.

В способе количественной оценки аденовирусных частиц с помощью АЕХ-УРЛС отрицательно заряженные частицы захватываются посредством их взаимодействия с положительно заряженной колонкой, содержащей катионы четвертичного аммония. Увеличение концентрации соли в подвижной фазе ослабляет электростатические взаимодействия, так что вирусные частицы элюируются со временем удерживания, специфичным для их серотипа, отдельно от матричных компонентов и примесей. Затем частицы количественно оценивают по поглощению УФ-излучения при 214 нм.

Капиллярный зонный электрофорез (СЕ)

Капиллярный зонный электрофорез (СЕ) используется для определения концентрации аденовирусных частиц. В этом способе образец, содержащий вирусные частицы, проходит через капилляр малого диаметра посредством электроосмотического потока. Различные компоненты в образце имеют различные значения электрофоретической подвижности из-за различий в размере, заряде и коэффициенте трения. Это приводит к разделению различных компонентов на полосы.

После элюирования выявляют пик, соответствующий аденовирусным частицам, и количественно оценивают по поглощению при 214 нм. Сигнал преобразовывают в концентрацию по калибровочному стандарту.

Анализ собственной флуоресценции

Капсидные белки аденовирусов содержат ароматические аминокислоты, переизлучающие свет после возбуждения, в частности триптофан и в меньшей степени тирозин и фенилаланин. Максимум излучения и квантовый выход триптофана сильно зависят от полярности его среды. В полярной водной среде (например, на поверхности глобулярного белка) квантовый выход является относительно низким, тогда как в неполярной среде (например, внутри агрегата) квантовый выход возрастает. Эта особенность делает флуоресценцию триптофана применимым инструментом для изучения конформационного изменения, агрегации и межмолекулярных взаимодействий белков.

В анализе собственной флуоресценции образцы переносят в трех повторностях в УФ-проницаемый плоскодонный микропланшет. Планшет закрывают УФ-проницаемой герметичной крышкой. Флуоресценцию триптофана измеряют с помощью микропланшетного ридера с использованием фильтра возбуждения с центральной длиной волны 280 нм и шириной полосы пропускания 10 нм, а также эмиссионного фильтра с центральной длиной волны 340 нм и шириной полосы пропускания 10 нм. Для сведения к минимуму влияния герметичной крышки и формы мениска используют оптически прозрачное дно.

Из уровня техники известно, что интенсивность флуоресценции является чувствительной мерой разрушения аденовируса. При стрессе может наблюдаться усиление или ослабление в зависимости от природы изменений, происходящих в образце. Ожидается, что развертывание белка и диссоциация капсида приведут к ослаблению собственной флуоресценции, и ожидается, что агрегация приведет к ее усилению. Величина погрешности анализа составляет $< 5\%$ (% CV) в используемом диапазоне.

Полученную флуоресценцию образцов, подвергнутых стрессу, всегда следует сравнивать с таковой у контрольных образцов. Поскольку увеличение или уменьшение после приложенного стресса зависит от пути разрушения и специфично для каждого активного фармацевтического ингредиента (API), его нельзя предсказать. Изменение (усиление или ослабление) по сравнению с образцами в $t=0$ свидетельствует о меньшей стабильности состава. Образцы,

подвергнутые стрессу, значения которых остаются близкими к значениям образцов в $t=0$, являются более стабильными.

Концентрация белка по поглощению при 280 нм

Капсидные белки аденовирусов содержат ароматические аминокислоты, которые поглощают ультрафиолетовый свет около 280 нм, в частности триптофан и в меньшей степени тирозин и фенилаланин. Поглощение линейно коррелирует с количеством аминокислот в длине оптического пути и, следовательно, с концентрацией белка, в соответствии с законом Бера-Ламберта. Поскольку вирусные частицы также рассеивают свет, что приводит в результате к видимому поглощению, зависящему от длины волны, сигнал сначала корректируется для этого сигнала рассеяния с получением истинного сигнала поглощения. Затем поглощение при 280 нм либо переводится в концентрацию белка по калибровочной кривой, либо непосредственно сравнивается между образцами в качестве количественной меры концентрации белка.

Вирус совместим с первичным контейнером для балк-формы, таким как биотехнологический мешок, если, среди прочего, он характеризуется минимальной потерей (т. е. $0,3 \log/2$ года) в отношении количества и эффективности и не проявляет существенных изменений. Дополнительно, при визуальном исследовании не должно наблюдаться никаких признаков агрегации, осаждения, изменения цвета и/или прозрачности.

В контексте настоящей заявки "приблизительно" означает $\pm 10\%$, если не указано иное.

В контексте настоящей заявки "пластик" означает синтетический или полусинтетический пластичный (со)полимер на основе одной или нескольких органических молекул. Это включает пленки, состоящие из нескольких слоев, таких как слой, контактирующий с жидкостью, газонепроницаемый слой и наружные слои, из которых по меньшей мере слой, контактирующий с жидкостью, является пластиком. Примерами разновидностей пластика, используемых в настоящей заявке, являются этиленвинилацетат (в том числе монослой), полиэтилен (ультранизкой плотности), полиамид и полиэтилен.

В контексте настоящей заявки "мешок" означает биотехнологический контейнер, изготовленный из пластика, который может использоваться в способе изготовления вирусов, с целью хранения промежуточных продуктов или (балк-формы) вирусов или в качестве первичной упаковки. Примерами мешков, используемых в настоящей заявке, являются, например, мешки Flexboy, мешки NuQ, мешки PureFlex, мешки wave, мешки-биореакторы и т. д. Эти мешки обычно называются биотехнологическими мешками. Термин "мешок" и "биотехнологический мешок" в настоящей заявке могут использоваться взаимозаменяемо.

В контексте настоящей заявки "полимер" означает большую молекулу или макромолекулу, состоящую из многих повторяющихся субъединиц (мономеров).

В контексте настоящей заявки "сополимер" означает два или больше разных мономера, объединенных вместе.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения биотехнологический мешок изготовлен из полимера. В более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения указанный полимер выбран из группы этиленвинилацетата (в том числе монослоя), полиэтилена (ультранизкой плотности), полиамида и полиэтилена.

В контексте настоящей заявки "циклодекстрин" означает группу циклических олигосахаридов. В число наиболее часто используемых форм входят α -, β - и γ -циклодекстрины, которые содержат соответственно 6, 7 и 8 молекул глюкозы. В соответствии с настоящим изобретением циклодекстрины, которые обеспечивают защиту вирусов от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, в мешках, представляют собой β -циклодекстрины. Также пригодными являются замещенные производные, такие как диметил- β -циклодекстрин, 2-гидроксиэтил- β -циклодекстрин, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин, 3-гидроксипропил- β -циклодекстрин, и триметил- β -циклодекстрин, и 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин. Для последней группы молекул "молярное замещение (MS)" в контексте настоящей заявки означает среднее число гидроксипропильных групп на звено ангидроглюкозы.

В контексте настоящей заявки "степень замещения (DS)" означает число гидроксипропильных групп на молекулу циклодекстрина.

В контексте настоящей заявки "газонепроницаемый барьер" означает непроницаемый для газа слой между двумя слоями мономеров, как, например, этилвиниловый спирт.

В контексте настоящей заявки "вес/вес" означает "в пересчете на вес" или "по весу", долю конкретного вещества в смеси, измеренную по весу или массе.

Настоящее изобретение относится к способам обеспечения защиты вирусов от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, в биотехнологических мешках. Благодаря этим способам улучшается совместимость с разновидностями пластика за счет сохранения количества, и эффективности (инфекционности), и качества вирусов в отличие от ранее раскрытых способов. Примечательно, что добавление β -циклодекстрина к раствору, содержащему вирус, помещенному в биотехнологический мешок, приводит в результате к исключительному сохранению количества, эффективности (инфекционности) и качества указанного вируса, благодаря чему улучшается общая совместимость указанного вируса с биотехнологическими мешками по сравнению с раствором без β -циклодекстрина.

Настоящее изобретение относится к способам обеспечения сохранения вирусов и родственных фармацевтических продуктов в растворе, предпочтительно применяемых в генной терапии и/или путях применения в вакцинах. Растворы, содержащие вирус, подходят для изготовления и хранения в диапазоне 2-8°C, при этом они также совместимы с парентеральным введением. Эти растворы можно также хранить при более низких температурах, например, -20°C или ниже, -40°C или ниже, -65°C или ниже, -80°C или ниже. Их также можно хранить при значениях температуры выше 8°C, например, при 25°C или даже более высоких.

Растворы, применяемые в настоящем изобретении, обеспечивают для вирусов в различных концентрациях совместимость с пластиком, и их можно вводить различным позвоночным организмам,

предпочтительно млекопитающим, и в особенности людям. Стабилизированные растворы, применяемые в способах по настоящему изобретению, представляют собой, например, композиции на основе вирусов, которые можно, например, вводить в виде вакцины, которая может предоставлять профилактическую пользу ранее не инфицированным индивидуумам и/или обеспечивать терапевтический эффект.

В предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения β -циклодекстрин, применяемый в способах по настоящему изобретению, выбран из группы диметил- β -циклодекстрина, 2-гидроксиэтил- β -циклодекстрина, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина, 3-гидроксипропил- β -циклодекстрина и триметил- β -циклодекстрина. В еще более предпочтительном варианте осуществления указанный β -циклодекстрин представляет собой 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин.

В предпочтительном варианте осуществления концентрация β -циклодекстрина в растворе, содержащем вирус, находится в диапазоне от приблизительно 1% (об./об.) до 30% (об./об.), например, от приблизительно 1,5% (об./об.) до 25% (об./об.), например, от приблизительно 2% (об./об.) до 20%, например, от приблизительно 2,5% (об./об.) до 20% (об./об.), например, от приблизительно 3% (об./об.) до 15% (об./об.), например, от приблизительно 3,5% (об./об.) до 10% (об./об.), например, приблизительно 5% (об./об.).

Следующие примеры представлены для иллюстрации настоящего изобретения, однако без ограничения этим его.

ПРИМЕРЫ

Пример 1

План и методика проведения эксперимента

Тестировали совместимость аденовирусного препарата, содержащего аденовирус Ad26, со стеклом и пластиком (как описано в [1]). Биотехнологические мешки Flexboy® (Sartorius Stedim Biotech GmbH) и стеклянные флаконы (Nuova Ompi) заполняли стандартным составом 1 (см. таблицу 1) с аденовирусами Ad26 в

концентрации $2,4 \times 10^{11}$ VP/мл. Биотехнологические мешки Flexboy® объемом 50 мл заполняли 20 мл состава, тогда как флаконы объемом 3 мл заполняли 1,5 мл (в обоих случаях в двух повторностях на каждое условие и каждый момент времени). Контрольные образцы отбирали из состава в $T=0$ перед заполнением мешков и флаконов.

Для оценки совместимости состава, содержащего аденовирус, с пластиковыми и стеклянными поверхностями мешки и флаконы инкубировали при $5 \pm 3^\circ\text{C}$ или при $25 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение четырех недель включительно с временными точками 1, 2, 4, 7 и 28 дней. В каждый момент времени образцы удаляли из мешков и флаконов и хранили при $\leq -65^\circ\text{C}$ до проведения анализа образцов.

Совместимость состава, содержащего аденовирус, с пластиком по сравнению со стеклом и по сравнению с контрольными образцами в $T=0$ анализировали следующими способами, которые описаны выше: интенсивность собственной флуоресценции белков; содержание белка гексона с помощью RP-UPLC; общее содержание белка по поглощению при 280 нм; концентрация аденовирусных частиц с помощью vp-QPCR; концентрация аденовирусных частиц с помощью АЕХ-UPLC и эффективность (инфекционность) с помощью анализа эффективности на основе QPCR (QPA). Анализы проводили со всеми мешками и флаконами во все моменты времени, за исключением анализа vp-QPCR, который проводили только для выбора образцов.

Чтобы дополнительно оценить неожиданное обнаружение того, что стандартный состав 1 несовместим с биотехнологическим мешком (см. раздел результатов), изучали дополнительные контактирующие материалы и моменты времени. Аденовирусы Ad26, находящиеся в составе 1 в концентрации $3,0 \times 10^{11}$ VP/мл, инкубировали при $5 \pm 3^\circ\text{C}$ или при $25 \pm 2^\circ\text{C}$ в течение шести месяцев включительно в биотехнологических мешках Flexboy® (Sartorius Stedim Biotech GmbH), в биотехнологических мешках NuQ Cx5-14 (Thermo Fisher) или в биотехнологических мешках PureFlex Mobius (Millipore); во всех случаях мешок объемом 50 мл заполняли 25 мл состава. Стеклянные флаконы (Nuova Ompi) включали в качестве контроля.

В моменты времени 0, 1, 2, 5, 6, 7 и 14 дней и 1, 2, 3, 4, 5 и 6 месяцев образцы удаляли из мешков и флаконов и

анализировали в отношении совместимости с использованием способов, описанных выше.

Результаты и выводы

На фиг. 1-3 показана совместимость аденовирусов Ad26 со стеклом или пластиком в составе 1. Собственная флуоресценция демонстрирует содержание белка и конформацию, площадь пика гексона - количество белка гексона, а поглощение при 280 нм - общую концентрацию белка. Результаты неожиданно показали, что количество (общего и вирусного) белка уменьшается при контакте состава 1 с пластиковой поверхностью уже через 1 день при 5 или 25°C. Это снижение наиболее сильное в течение первой недели, во время которой содержание белка снижается на приблизительно 20-30%. Разрушение лишь слегка уменьшается при более низкой температуре. Эффект явно вызван наличием пластиковой поверхности, поскольку в отношении материала не демонстрировались эти изменения содержания белка при инкубации в стеклянных флаконах. Эта несовместимость вирусов с пластиком является очень неожиданным обнаружением, поскольку пластиковые биотехнологические мешки обычно применяются для изготовления и хранения белков, вирусов и других биологических препаратов.

Концентрация вирусных частиц соответствует аналогичной тенденции (фиг. 4 и 5), при этом в случае образцов, контактирующих с биотехнологическими мешками, снижение составляло почти 50% по сравнению с отсутствием значительного снижения в случае образцов в стеклянных флаконах. На фиг. 6 показано, что эффект оказывает влияние на инфекционные частицы, так что эффективность уменьшается одновременно с уменьшением количества вирусных белков и частиц в образцах в биотехнологических мешках.

Аналогичный эффект наблюдали, когда образцы подвергали стрессу, обусловленному замораживанием/размораживанием (фиг. 7). После одного цикла замораживания/размораживания в отношении материала в мешках демонстрировалось явное снижение содержания белка, тогда как образец в стекле показал, что сам материал устойчив к этому стрессовому условию. Таким образом, хранение

вирусного материала в замороженном состоянии не является решением, которое может предотвратить разрушение, вызванное взаимодействием с поверхностью.

Для исследования того, является ли несовместимость специфичной для типа биотехнологического мешка, используемого на фиг. 1-7, также в отношении совместимости тестировали несколько других типов пластиковых мешков. На фиг. 8 показана эффективность, выраженная в виде концентрации инфекционных частиц, вирусного препарата, хранящегося в трех типах биотехнологических мешков, по сравнению со стеклянными флаконами. Эффективность сильно уменьшается как при 5°C, так и при 25°C, когда вирусный материал контактирует с любым из разновидностей пластика. С другой стороны, вирусный материал, хранящийся в стеклянных флаконах, демонстрирует хорошую совместимость и разрушается гораздо медленнее, чем в биотехнологических мешках при обеих температурах. Это показывает, что несовместимость вирусов с разновидностями пластика не зависит от типа пластика, и что проблему нелегко устранить путем замены на другой тип мешка.

Результаты демонстрируют, что в стандартном составе 1 разрушение происходит быстро при контакте с пластиковой поверхностью, и что эта несовместимость не может быть легко устранена, например, путем хранения при более низкой температуре, в замороженном состоянии или в другом типе пластика. Это создает реальную проблему для изготовления, транспортировки и хранения таких материалов, поскольку разновидности пластика обычно применяются в одноразовых биотехнологических мешках и контейнерах для хранения.

Пример 2

План и методика проведения эксперимента

Аденовирусный препарат, содержащий аденовирусы Ad26 (как описано в [1]), концентрировали и повторно составляли путем ультрафильтрации/диафильтрации (с применением установки Sartoslice с фильтром Pellicon XL Biomaх 300, Millipore) в составы 1, 2 и 3, определенные в таблице 1. Состав 1

представляет собой стандартный состав, который применяли в примере 1, состав 2 представляет собой обычно применяемый для аденовирусов состав, описанный в источнике литературы [2], и состав 3 представляет собой обычно применяемый буфер PBS. Три состава отличаются значением pH, буферными соединениями, а также наличием и концентрацией других вспомогательных веществ.

Затем половину материала разбавляли с использованием буфера соответствующего состава до $1,0 \times 10^{11}$ VP/мл (состав 1) или $1,5 \times 10^{11}$ VP/мл (составы 2 и 3). Другую половину помещали в исходный раствор гидроксипропил- β -циклодекстрина (HBCD) в буфере соответствующего состава с конечной концентрацией 5% (вес/вес) HBCD для получения составов 1, 2 и 3+HBCD (таблица 1). Эти составы также разбавляли до тех же титров, используя буфер соответствующего состава. Контрольные образцы отбирали из всех составов в T=0 перед тестированием совместимости материала с биотехнологическими мешками.

Таблица 1. Составы, тестируемые в данном исследовании

Состав	Состав 1	Состав 1+HBCD	Состав 2 (Evans et al. [2])	Состав 2 (Evans et al. [2])+HBCD	Состав 3 (PBS)	Состав 3 (PBS)+HBCD
рН	6,5	6,5	7,4	7,4	7,4	7,4
буфер	20 мМ гистидина	20 мМ гистидина	10 мМ Tris и 10 мМ гистидина	10 мМ Tris и 10 мМ гистидина	10 мМ Na ₂ HPO ₄ , 2 мМ KH ₂ PO ₄	10 мМ Na ₂ HPO ₄ , 2 мМ KH ₂ PO ₄
Криопротектор	5% (вес/вес) сахарозы	5% (вес/вес) HBCD и 5% (вес/вес) сахарозы	5% (вес/вес) сахарозы	5% (вес/вес) HBCD и 5% (вес/вес) сахарозы	не предусмотрено	5% (вес/вес) HBCD
регулятор тоничности	75 мМ NaCl	75 мМ NaCl	75 мМ NaCl	75 мМ NaCl	137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl	137 мМ NaCl, 2,7 мМ KCl
EtOH (%)	0,4	0,4	0,4	0,4	не	не

вес/вес)					предусмот рено	предусмотрено
PS-80 (% вес/вес)	0,02	0,02	0,02	0,02	не предусмот рено	не предусмотрено
EDTA (мМ)	0,1	0,1	0,1	0,1	не предусмот рено	не предусмотрено
другое	не предусмот рено	не предусмот рено	1 мМ MgCl ₂	1 мМ MgCl ₂	не предусмот рено	не предусмотрено

Для оценки совместимости составов 1, 2 и 3, содержащих аденовирус, с HBCD или без него с пластиком, биотехнологические мешки Flexboy® объемом 50 мл (Sartorius Stedim Biotech GmbH) заполняли 25 мл каждого состава в n=3 для каждого состава. Мешки инкубировали при 25 ± 2°C с временными точками 2 или 3 и 7 или 8 дней. В каждый момент времени образцы удаляли из мешков и хранили при ≤ -65°C до проведения анализа образцов.

Совместимость составов, содержащих аденовирус, с пластиком анализировали следующими способами, которые описаны выше: интенсивность собственной флуоресценции белков; содержание белка гексона с помощью RP-UPLC и концентрация аденовирусных частиц с помощью СЕ. Анализ флуоресценции белков и RP-UPLC проводили соответственно в трех и двух повторностях со всеми тремя мешками на каждый состав. СЕ проводили для двух из трех контейнеров, получая одно регистрируемое значение на контейнер и момент времени.

Результаты и выводы

Результаты, представленные на фиг. 9-11, ясно показывают, что составы 1, 2 и 3, содержащие аденовирус, без HBCD были несовместимы с пластиком во время кратковременного хранения при 25°C. Наблюдаются снижения в собственной флуоресценции белков, содержании гексона и концентрации вирусных частиц. Это указывает на то, что концентрация (инфекционных) вирусных частиц и белков снижается в составах примерно на треть в течение одной недели. Как показано в примере 1, Ad26 в составе 1 является стабильным в

этих условиях, например, принимая во внимание содержание белков и частиц, при хранении в совместимом материале первичной упаковки, таком как стекло. Состав 2 представляет собой стабильный для аденовирусов состав, описанный в литературном источнике [2]. Таким образом, наблюдаемая несовместимость специфична для поверхности биотехнологических мешков.

Наличие HBCD при 5% (вес/вес) в составах 1, 2 или 3+HBCD обеспечивало защиту аденовируса от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью. На фиг. 9-11 показано, что Ad26 в этих составах, дополненных HBCD, совместим с пластиком, принимая во внимание содержание белков и частиц. Эти данные показывают, что β -циклодекстрины обеспечивают защитный эффект в отношении вызванного взаимодействием с пластиковой поверхностью разрушения вирусов, которые содержатся в жидких составах в биотехнологических мешках. Важно отметить, что, поскольку эффект наблюдался во всех трех составах, несмотря на их различия по значениям pH и вспомогательным веществам, эффект специфичен для HBCD и не зависит от состава.

Пример 3

План и методика проведения эксперимента

В приведенных выше примерах было продемонстрировано, что составы, содержащие вирусы, неожиданным образом являются несовместимыми с пластиковыми биотехнологическими мешками, и что добавление HBCD обеспечивает защиту от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью указанных мешков. Чтобы определить диапазон концентраций, в пределах которого HBCD обеспечивает защиту от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, проводили следующий эксперимент. Аденовирусный препарат, содержащий аденовирусы Ad26 (как описано в [1]), концентрировали и повторно составляли путем ультрафильтрации/диафильтрации (с применением установки Sartoslice с фильтром Pellicon XL Biomax 300, Millipore) в состав 2, определенный в таблице 1. Состав 2 представляет собой обычно применяемый для аденовирусов состав, описанный в литературном источнике [2]. Затем состав дополняли 0, 0,2, 1 или

5% (вес/вес) гидроксипропил- β -циклодекстрина (HBCD). Все составы доводили до одного и того же титра путем разбавления буфером состава 2. Контрольные образцы отбирали из всех составов в T=0 перед тестированием совместимости материала с пластиком.

Чтобы оценить совместимость составов, содержащих аденовирус, с различными концентрациями HBCD с пластиком, биотехнологические мешки Flexboy® объемом 5 мл (Sartorius Stedim Biotech GmbH) заполняли 4 мл каждого состава в n=2 для каждого состава. Контейнеры инкубировали при $25 \pm 2^\circ\text{C}$ для исследования совместимости с временными точками 3 и 8 дней. В каждый момент времени образцы удаляли из мешков и хранили при $\leq -65^\circ\text{C}$ до проведения анализа образцов.

Совместимость составов, содержащих аденовирус, с пластиком анализировали следующими способами, которые описаны выше: интенсивность собственной флуоресценции белков; содержание белка гексона с помощью RP-UPLC; общее содержание белка по поглощению при 280 нм; концентрация аденовирусных частиц с помощью vp-qPCR и эффективность с помощью анализа эффективности на основе qPCR (QPA).

Результаты и выводы

На фиг. 12-16 показаны соответственно собственная флуоресценция белков, общая концентрация белков согласно поглощению при 280 нм, содержание белка гексона согласно RP-UPLC, концентрация аденовирусных частиц согласно CE и эффективность согласно QPA для четырех составов после 8 дней контактирования с пластиковым биотехнологическим мешком. В T=0 содержание белков и частиц во всех составах было одинаковым, но после инкубации наблюдалось четкое снижение этих характеристик в зависимости от концентрации HBCD в составе. Состав с 5% HBCD был совместимым с пластиком, тогда как в составах с 0 или 0,2% HBCD происходило значительное разрушение при контактировании с пластиком, при этом в отношении концентрации вирусных белков, содержания частиц и эффективности наблюдалось 20-30% снижение. Состав с 1% HBCD демонстрировал некоторое улучшение в отношении совместимости, но не настолько, как состав с 5% HBCD. Таким

образом, НВCD может обеспечивать защиту от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, даже при концентрации 1%, но его действенность возрастает при более высоких концентрациях.

При значениях от выше 5% до по меньшей мере 30% включительно достигается полная защита, и составы совместимы с пластиком. Верхний предел концентрации НВCD, таким образом, определяется ограничениями в отношении безопасности и способности проходить через иглу при инъекции. НВCD хорошо растворим в водных растворах, а вязкость и, следовательно, способность состава проходить через иглу при инъекции остаются в рабочих диапазонах вплоть до концентрации НВCD 50% [3]. НВCD имеет хороший профиль безопасности и переносимости, и никаких побочных эффектов не наблюдалось после парентерального введения до 24 г НВCD в сутки [4]. Раствор с 30% НВCD имеет осмолярность приблизительно 200-215 мОсм/л в зависимости от молярного замещения и, таким образом, может быть частью изотонического состава. Принимая во внимание факторы совместимости, вязкости и способности проходить через иглу при инъекции, безопасности и переносимости, диапазон, при котором НВCD может применяться для обеспечения защиты от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, составляет от 1% (вес/вес) до 30% (вес/вес).

ССЫЛКИ

1. Zahn, R., et al., Ad35 and ad26 vaccine vectors induce potent and cross-reactive antibody and T-cell responses to multiple filovirus species. 2012.
2. Evans, R.K., et al., Development of stable liquid formulations for adenovirus-based vaccines. J Pharm Sci, 2004. 93(10): p. 2458-75.
3. Dusautois, C. and S. Neves, Hydroxypropyl Betacyclodextrin: An Enabling Technology for Challenging Pharmaceutical Formulations. Roquette, 2009.
4. Loftsson, T. and M.E. Brewster, Pharmaceutical applications of cyclodextrins: basic science and product development. Journal of pharmacy and pharmacology, 2010. 62(11): p. 1607-1621.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Способ обеспечения защиты вируса от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, где указанный вирус содержится в растворе, находящемся в мешке, состоящем из пластика, и где указанный способ включает стадию добавления β -циклодекстрина к указанному раствору в концентрации от приблизительно 1% (вес/вес) до приблизительно 30% (вес/вес).

2. Способ по п. 1, где указанный β -циклодекстрин выбран из группы диметил- β -циклодекстрина, 2-гидроксиэтил- β -циклодекстрина, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина, 3-гидроксипропил- β -циклодекстрина и триметил- β -циклодекстрина.

3. Способ по п. 2, где указанный β -циклодекстрин представляет собой 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин.

4. Способ по любому из пп. 1-3, где указанный пластик выбран из группы этиленвинилацетата, полиамида и полиэтилена.

5. Способ по любому из пп. 1-4, где указанный мешок представляет собой биотехнологический мешок.

6. Способ по любому из пп. 1-5, где указанный вирус представляет собой аденовирус.

7. Применение β -циклодекстрина для обеспечения защиты вируса от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, где указанный вирус содержится в растворе, который содержится в пластиковом биотехнологическом мешке.

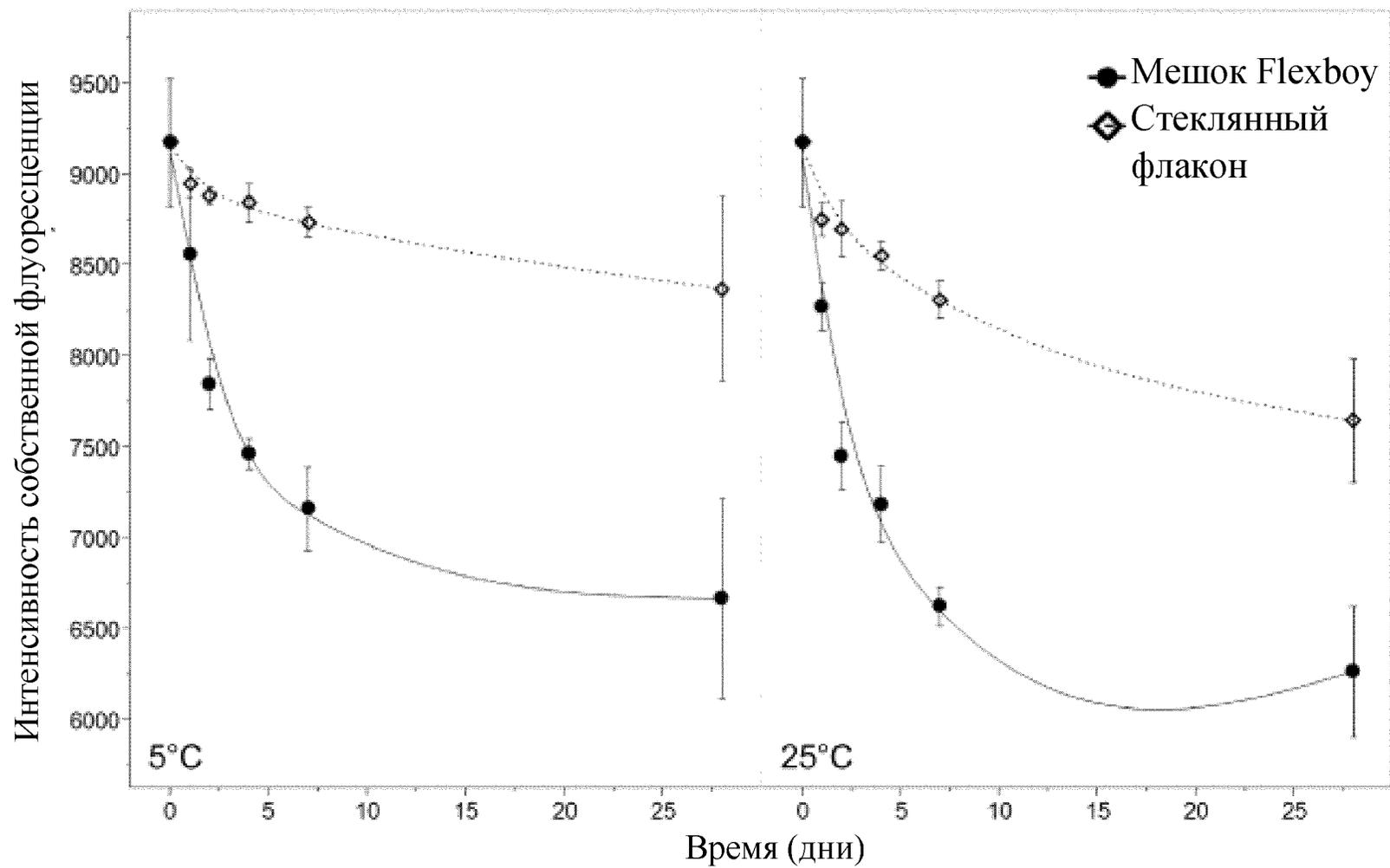
8. Применение β -циклодекстрина для обеспечения защиты вируса от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, по п. 7, где указанный β -циклодекстрин выбран из группы диметил- β -циклодекстрина, 2-гидроксиэтил- β -циклодекстрина, 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина, 3-гидроксипропил- β -циклодекстрина и триметил- β -циклодекстрина.

9. Применение β -циклодекстрина для обеспечения защиты вируса от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, по п. 8, где указанный β -циклодекстрин представляет собой 2-гидроксипропил- β -циклодекстрин.

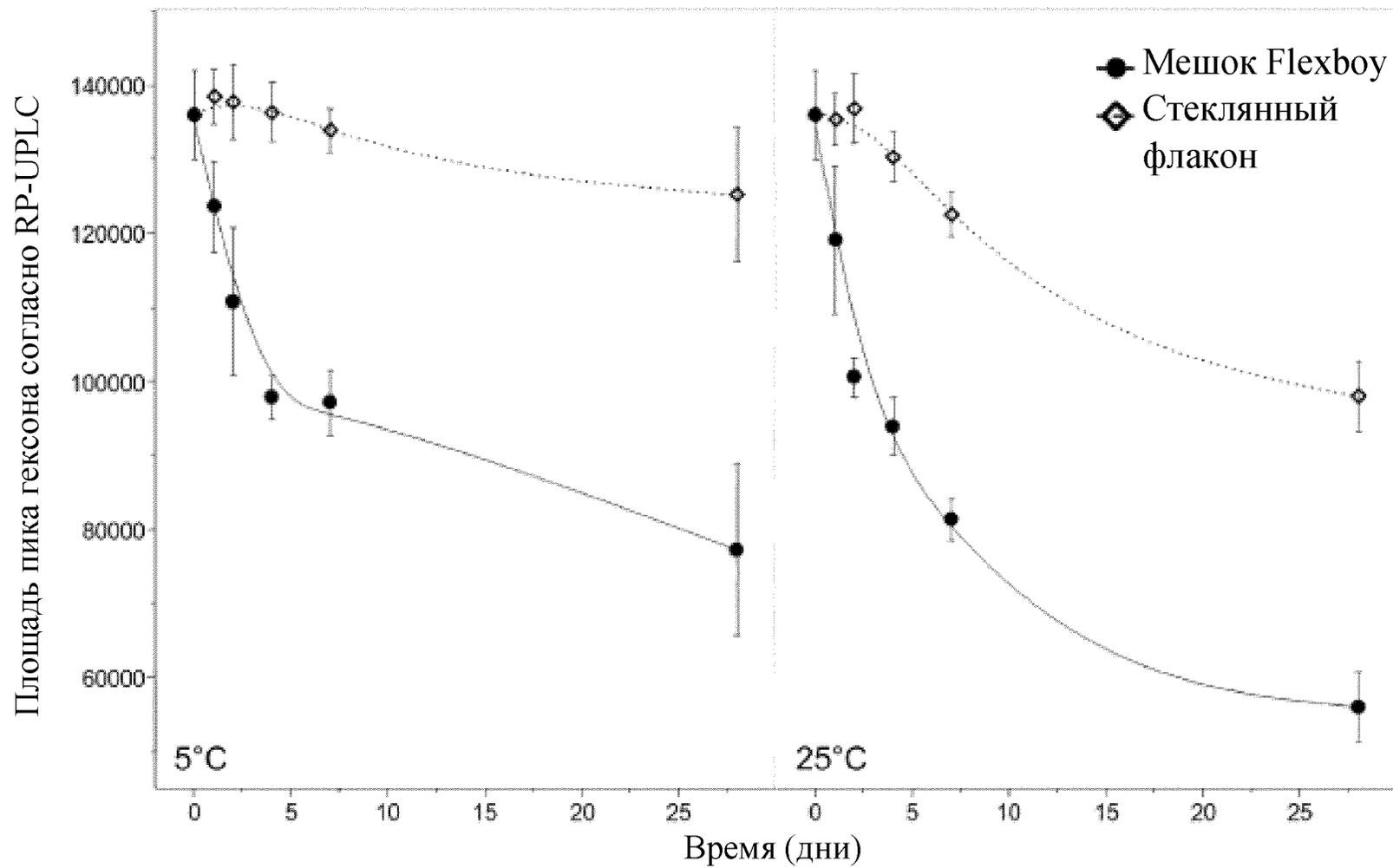
10. Применение β -циклодекстрина для обеспечения защиты вируса от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, по любому из пп. 7-9, где указанный пластик выбран из группы этиленвинилацетата, полиамида и полиэтилена.

11. Применение 2-гидроксипропил- β -циклодекстрина для обеспечения защиты аденовируса от разрушения, вызванного взаимодействием с поверхностью, где указанный аденовирус содержится в растворе, который содержится в биотехнологическом мешке из этиленвинилацетата.

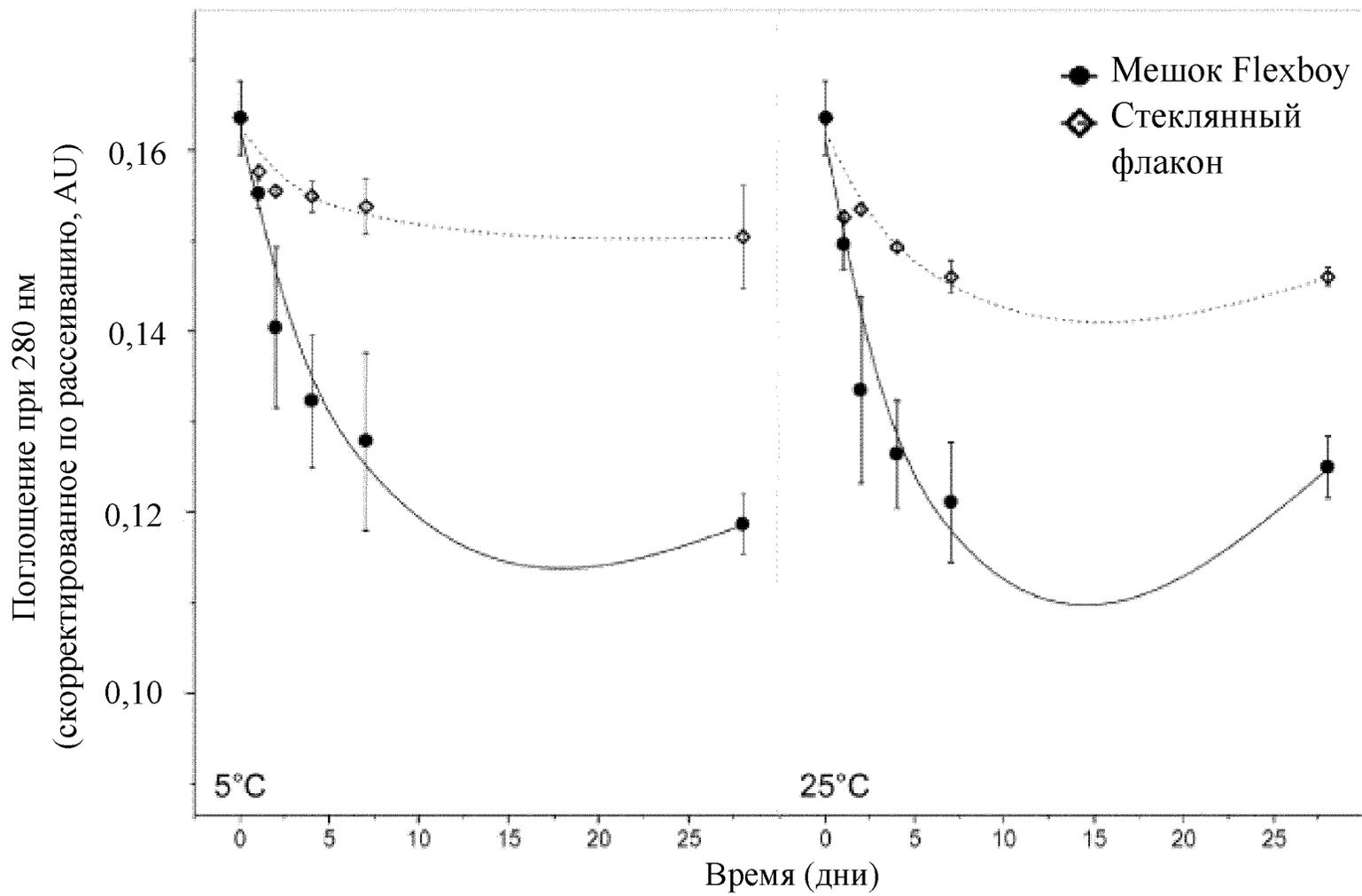
По доверенности



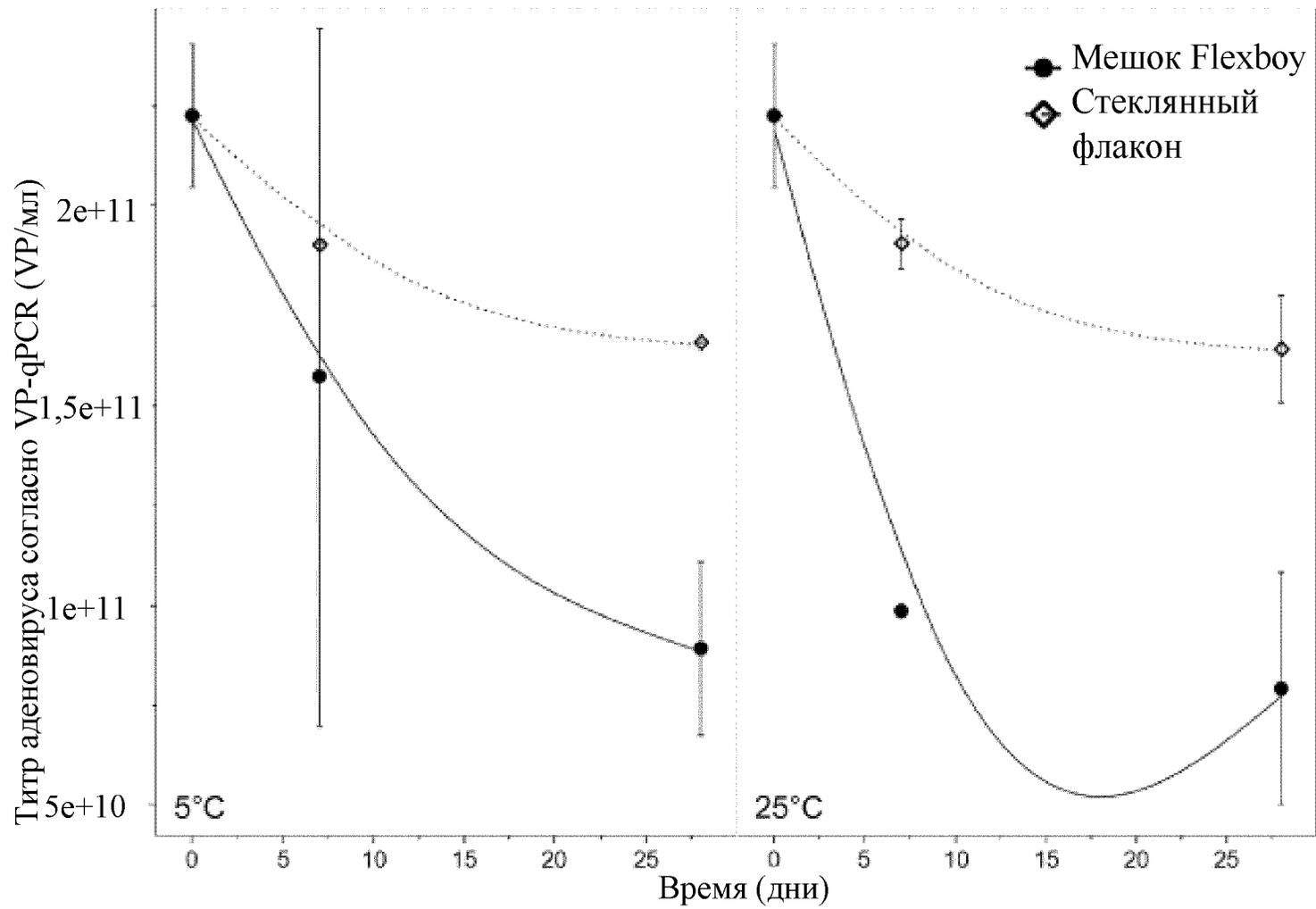
Фиг. 1



ФИГ. 2

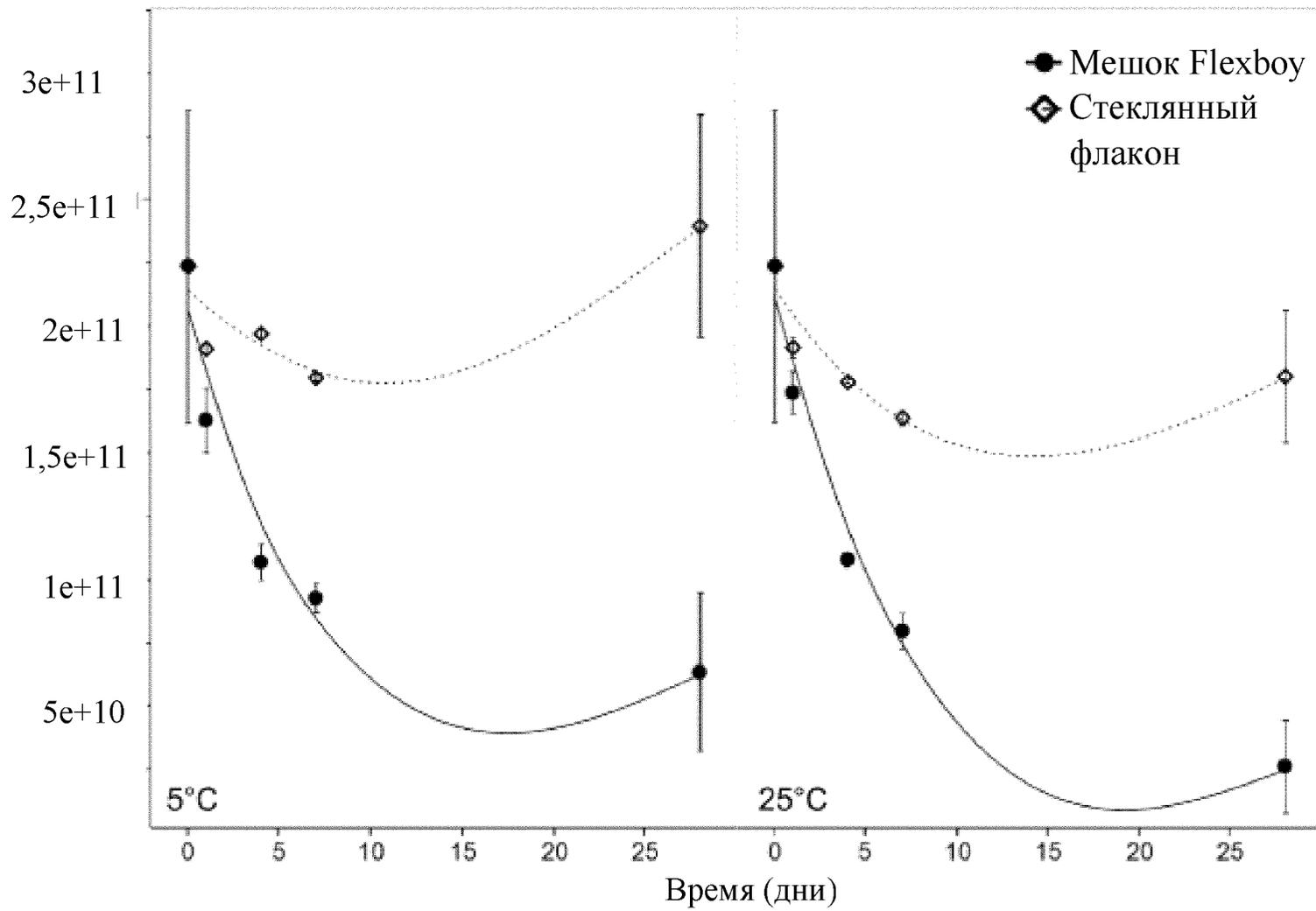


Фиг. 3

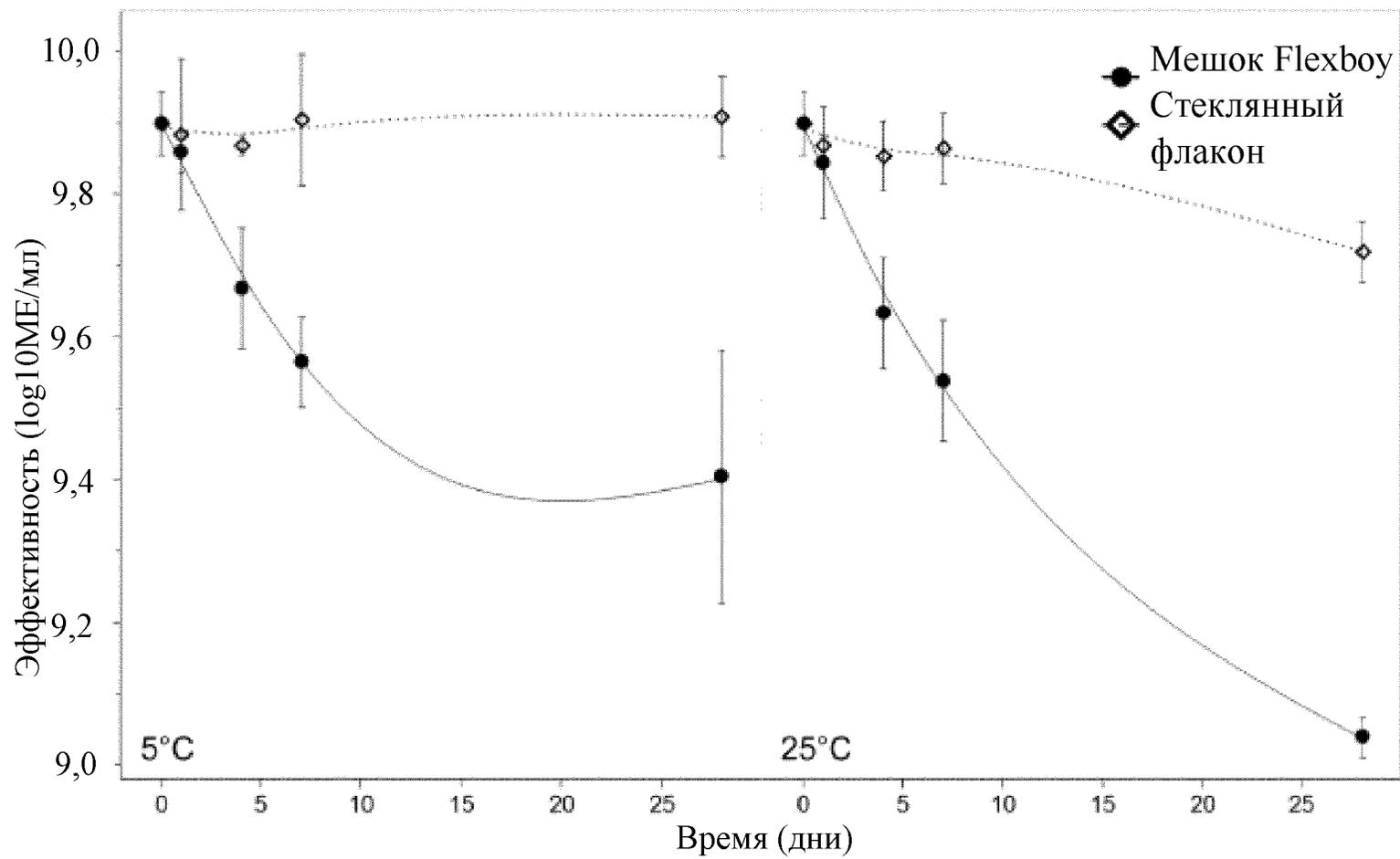


ФИГ. 4

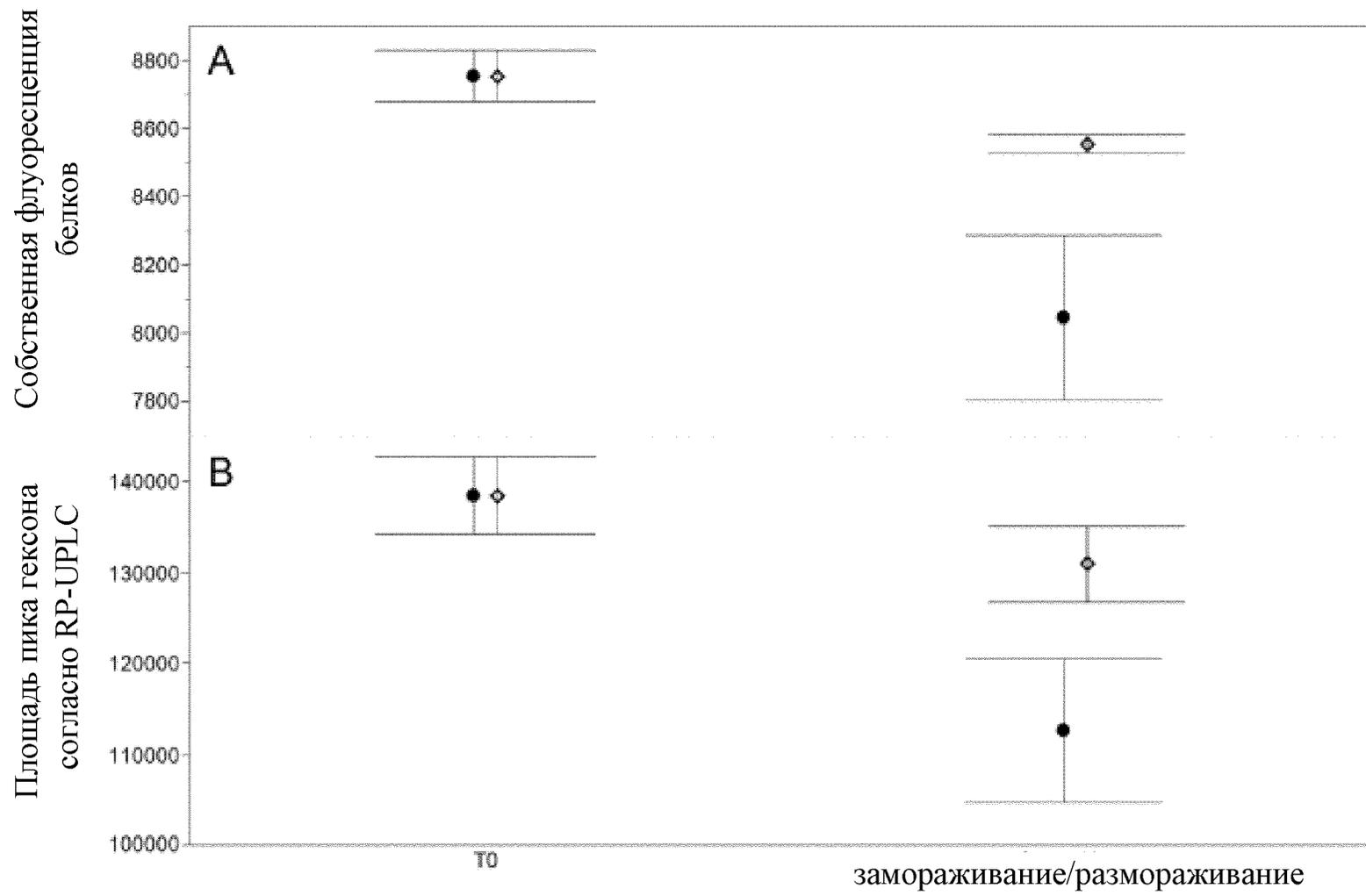
Концентрация аденовируса согласно АЕХ-UPLC (VP/мл)



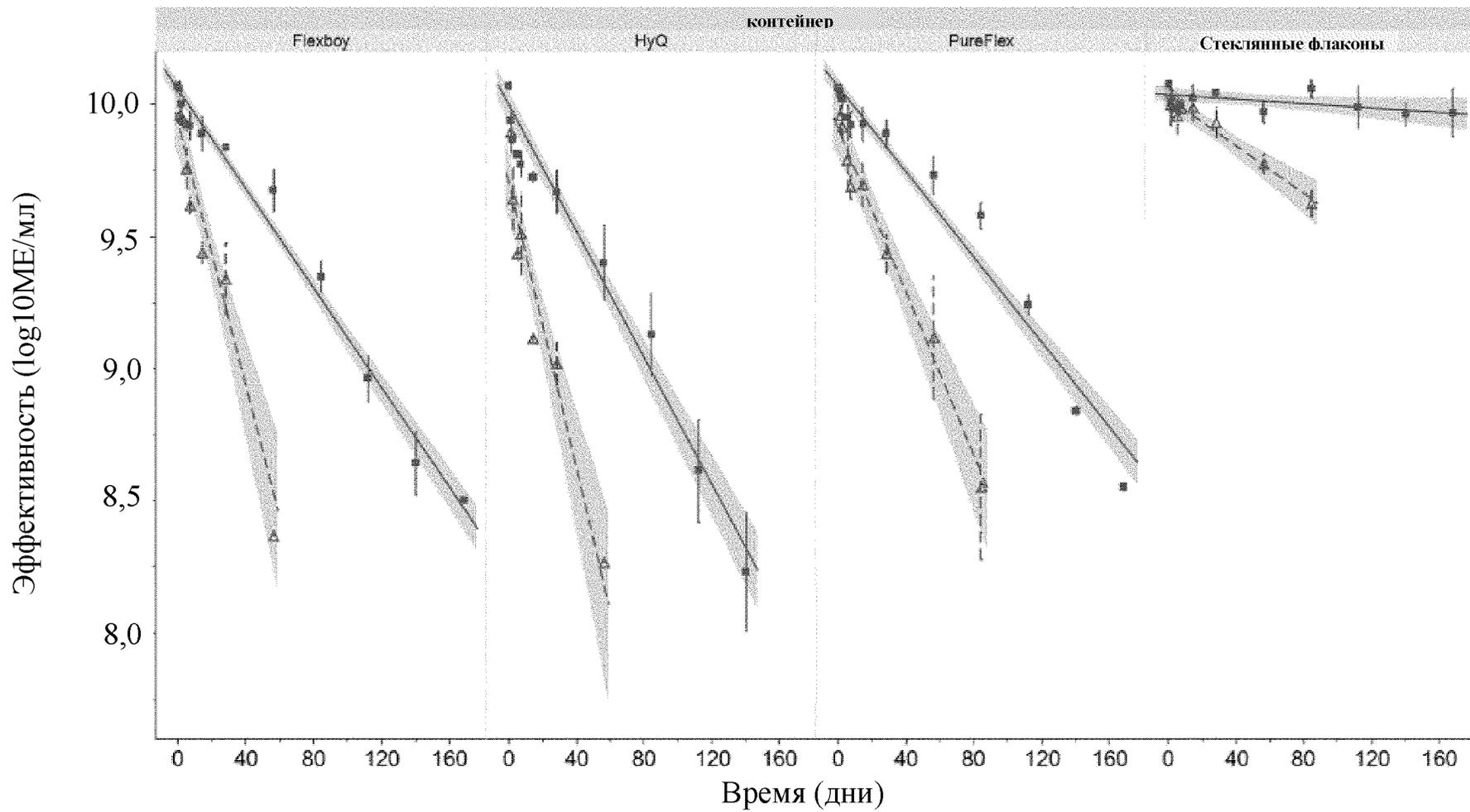
Фиг. 5



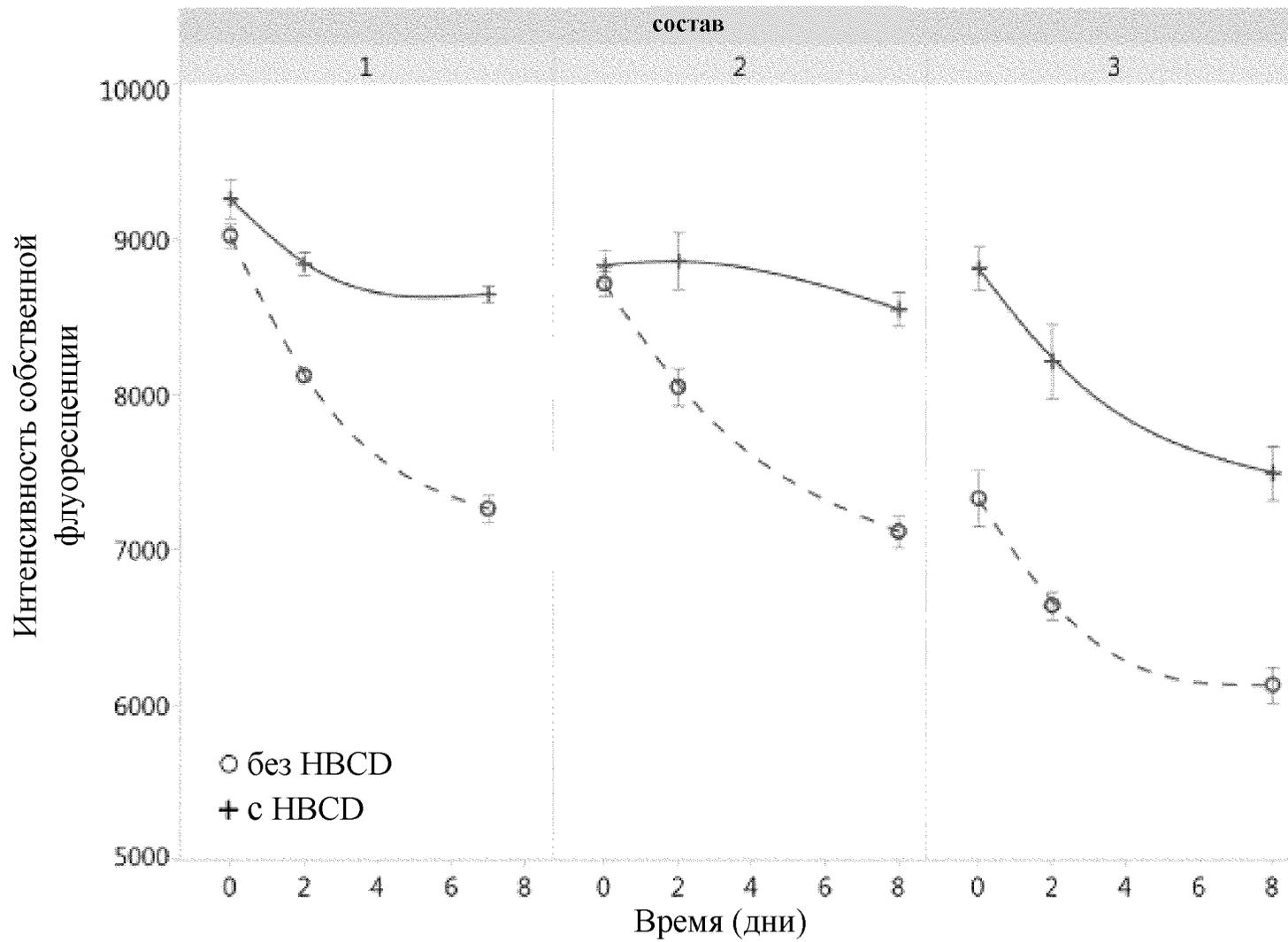
Фиг. 6



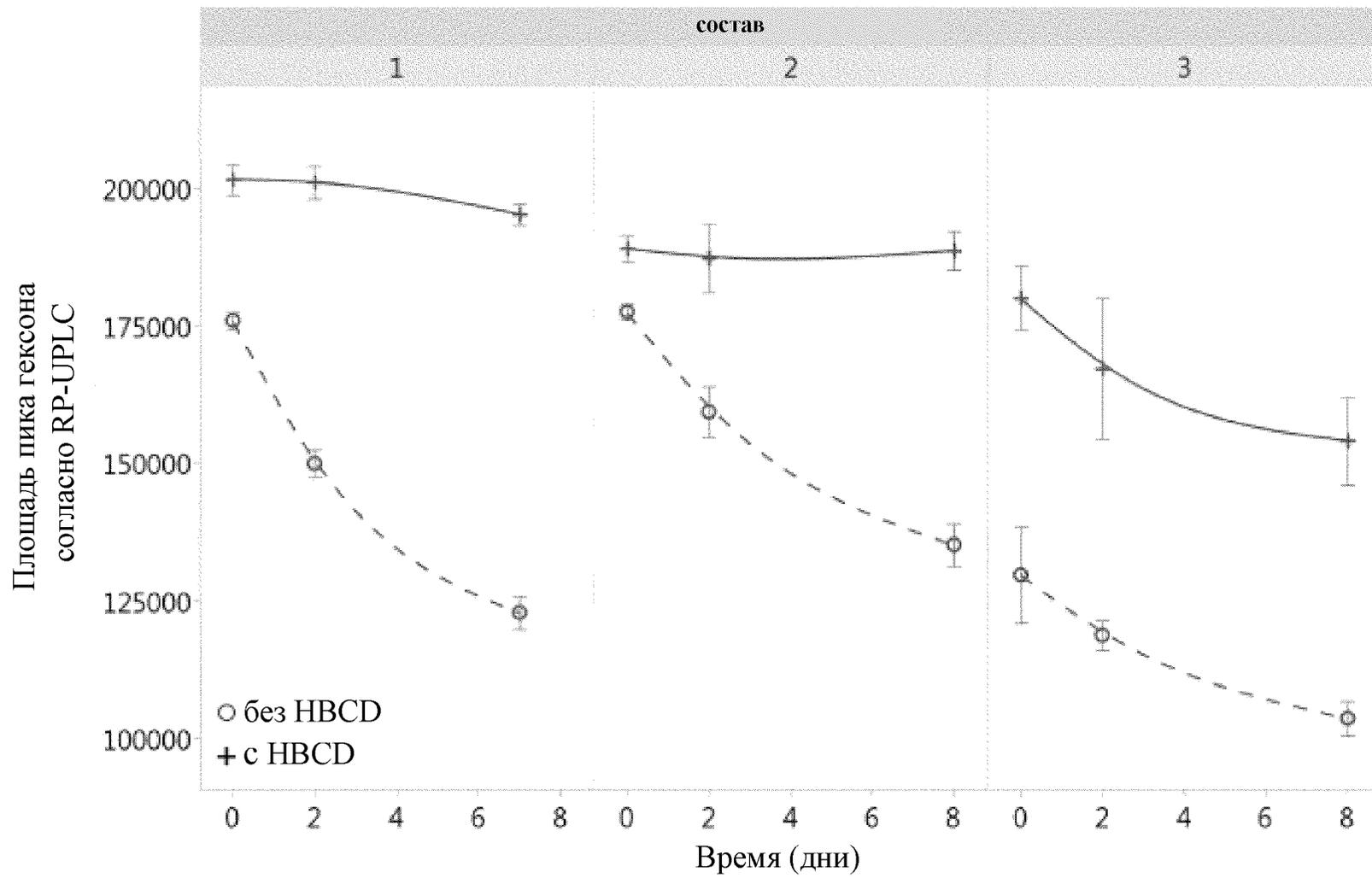
Фиг. 7



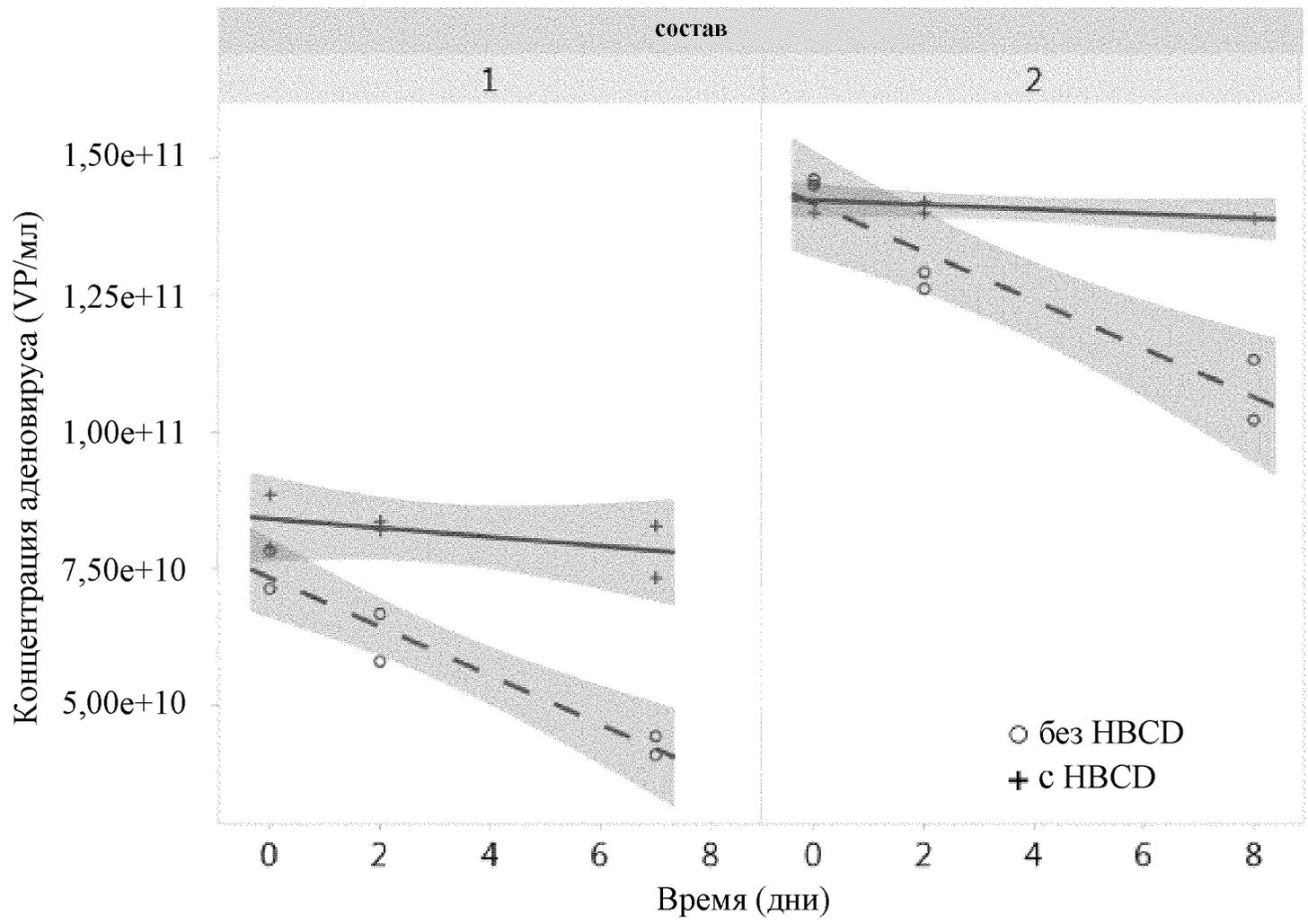
Фиг. 8



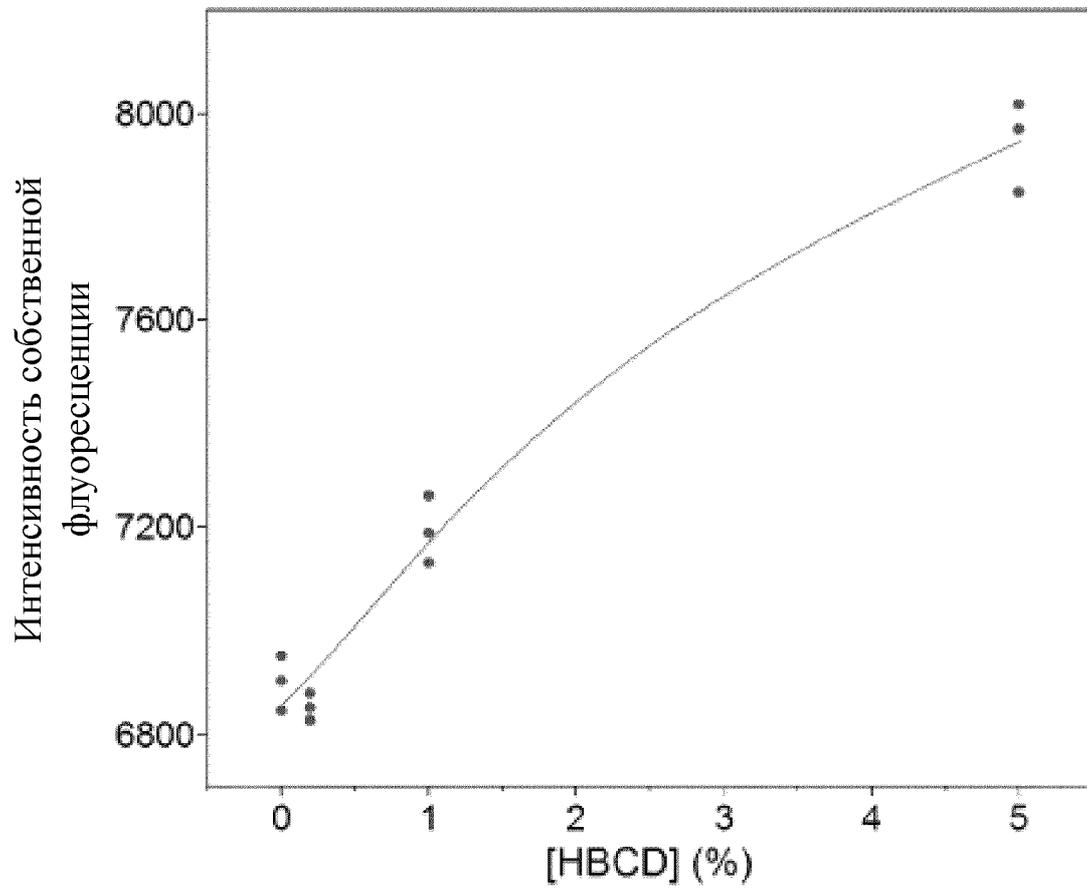
Фиг. 9



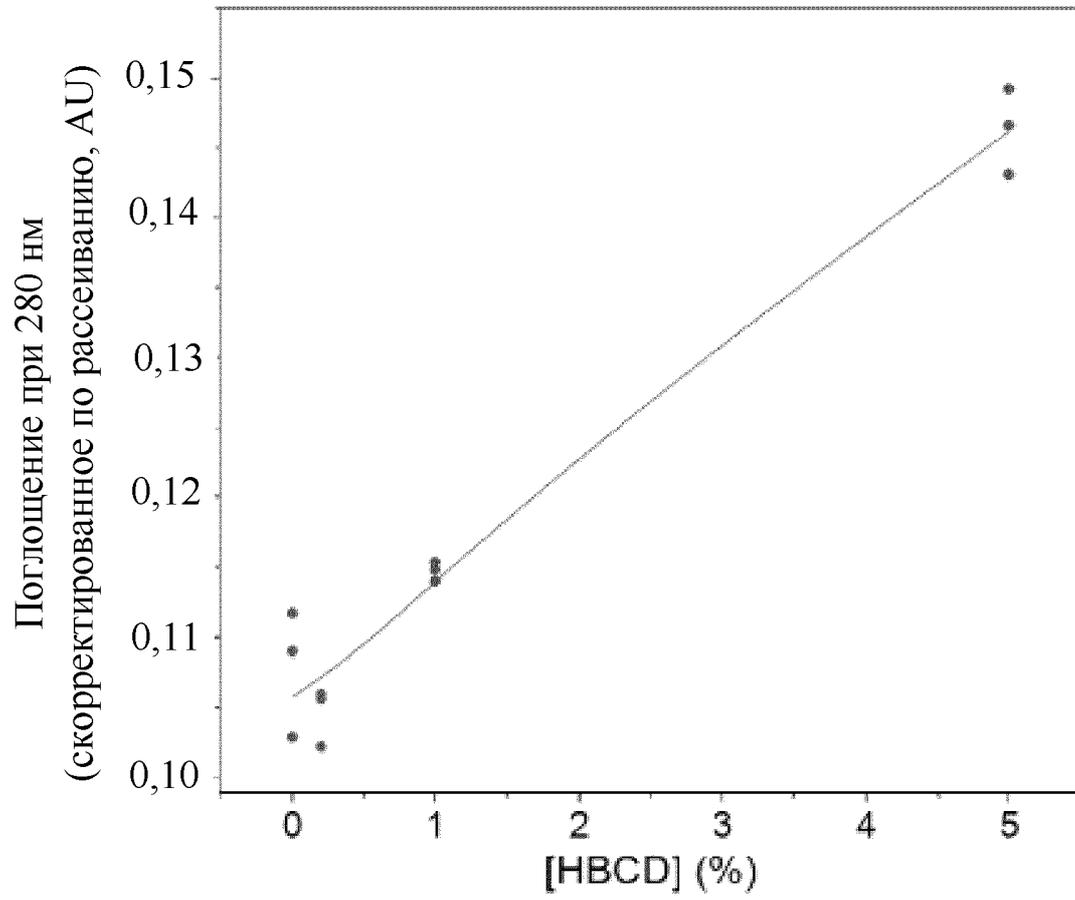
Фиг. 10



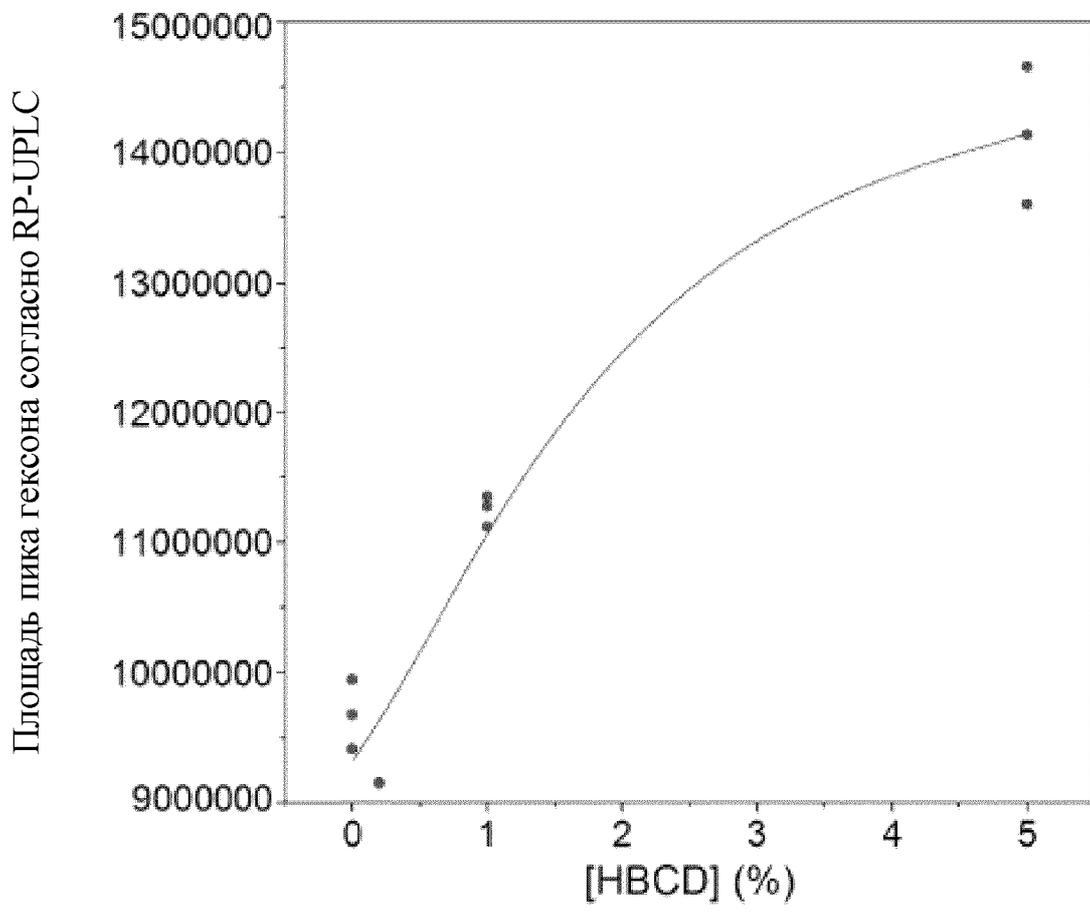
Фиг. 11



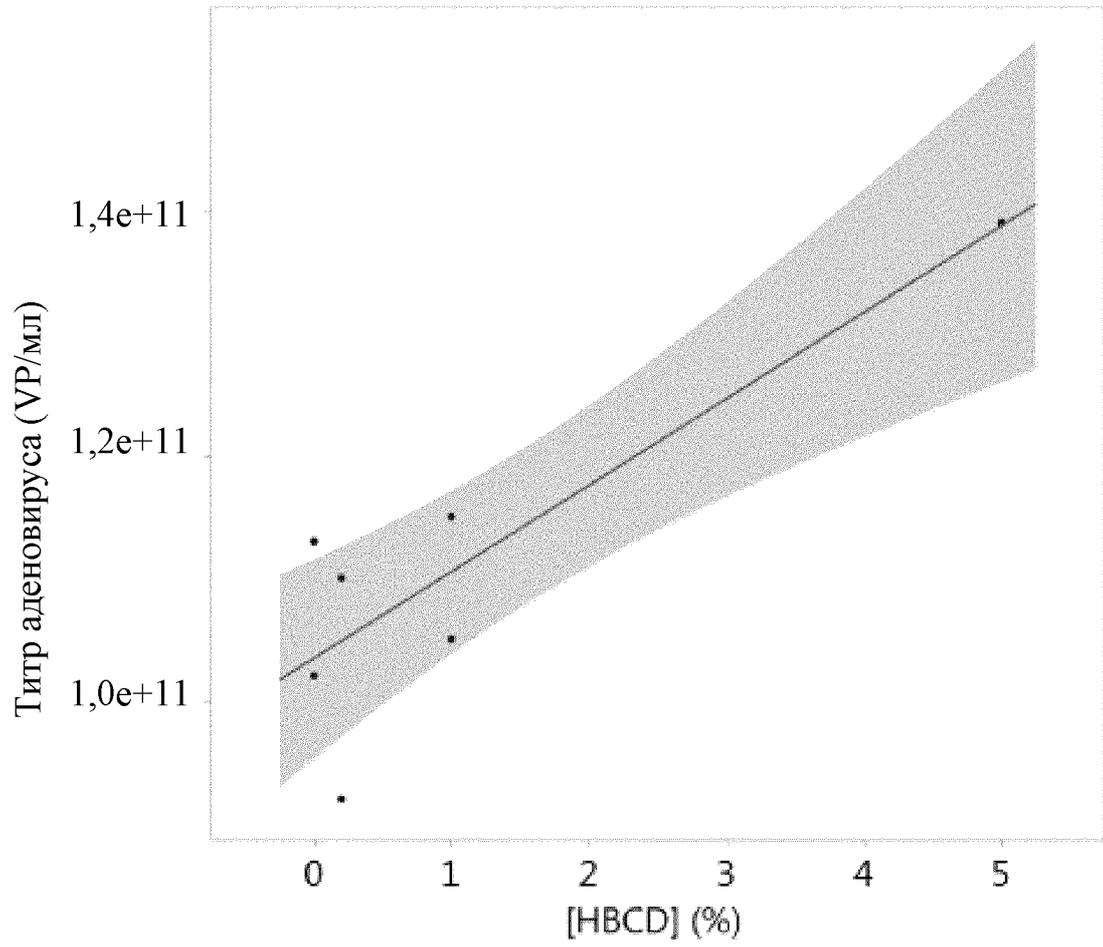
Фиг. 12



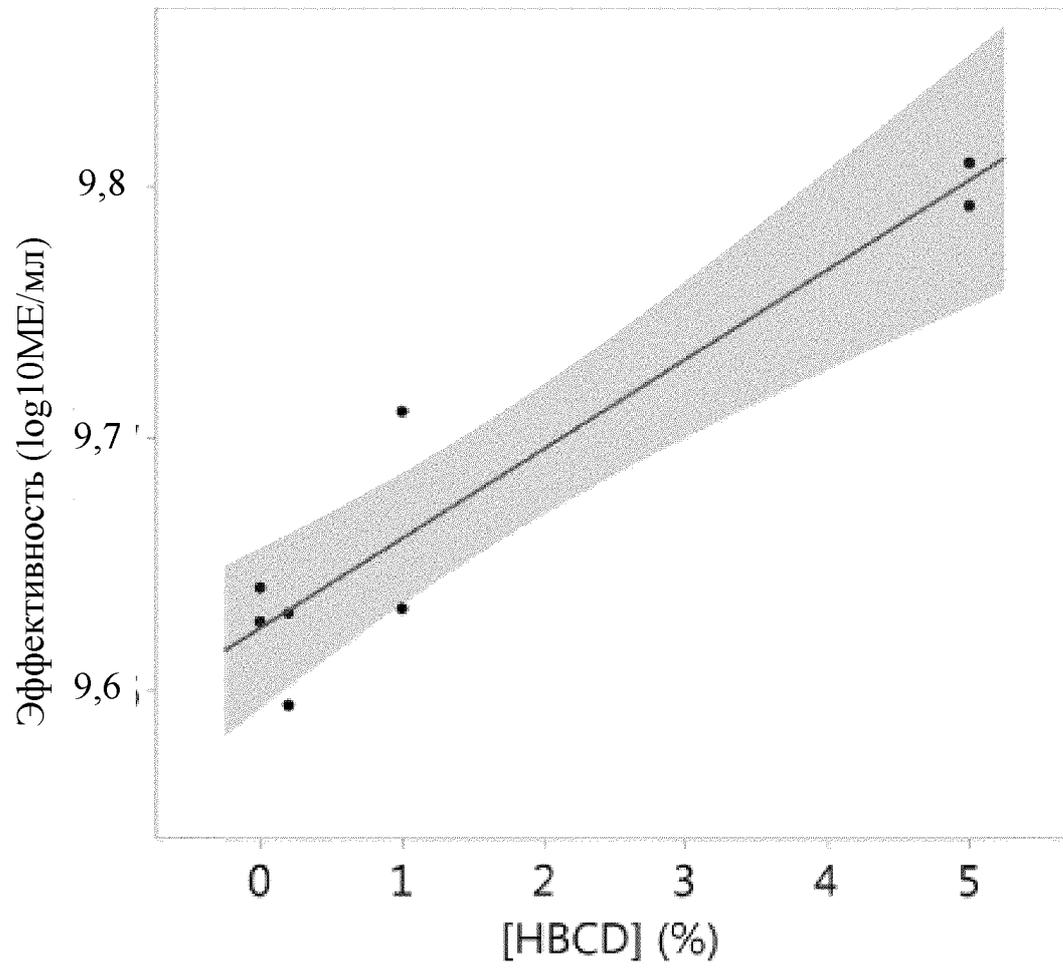
Фиг. 13



Фиг. 14



Фиг. 15



Фиг. 16