

(19)



**Евразийское
патентное
ведомство**

(11) **036046**

(13) **B1**

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОМУ ПАТЕНТУ

(45) Дата публикации и выдачи патента
2020.09.18

(21) Номер заявки
201690613

(22) Дата подачи заявки
2014.09.16

(51) Int. Cl. *A61K 9/00* (2006.01)
A61K 47/02 (2006.01)
A61K 47/10 (2006.01)
A61K 47/12 (2006.01)
A61K 47/18 (2006.01)
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)

(54) КОМПОЗИЦИЯ ДЛЯ СТАБИЛИЗАЦИИ КОЛИЧЕСТВА, ЭФФЕКТИВНОСТИ, ИНФЕКЦИОННОСТИ И КАЧЕСТВА АДЕНОВИРУСОВ

(31) 13185200.6

(32) 2013.09.19

(33) EP

(43) 2016.08.31

(86) PCT/EP2014/069654

(87) WO 2015/040002 2015.03.26

(71)(73) Заявитель и патентовладелец:
**ЯНССЕН ВЭКСИНС ЭНД
ПРЕВЕНШН Б.В. (NL)**

(72) Изобретатель:
Адриансен Яник (NL)

(74) Представитель:
Медведев В.Н. (RU)

(56) WO-A1-0029024

US-A1-2005085427

ROBERT K. EVANS ET AL.: "Development of Stable Liquid Formulations for Adenovirus-Based Vaccines", JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES, AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION, WASHINGTON, US, vol. 93, no. 10, 1 October 2004 (2004-10-01), pages 2458-2475, XP007914498, ISSN: 0022-3549, DOI: 10.1002/jps.20157, Retrieved from the Internet: URL:10.1002/jps.20157 [retrieved on 2004-07-23] page 2468, line 64 - page 2473, line 2; table 1

(57) Настоящее изобретение относится к композиции для стабилизации количества, эффективности, инфекционности и качества аденовирусов, содержащей аденовирусы, цитрат, гидроксипропил-бета-циклодекстрин (HBCD), хлорид натрия, полисорбат-80 и в случае необходимости этанол.

B1

036046

**036046
B1**

Область изобретения

Настоящее изобретение относится к составам на основе аденовирусов и родственным фармацевтическим препаратам для применения, например, в генной терапии и/или путях применения в вакцинах. В частности, в настоящем описании раскрыты жидкие составы для аденовирусов, улучшающие стабильность аденовирусов путем сохранения количества, эффективности (инфекционности) и качества содержащихся в них аденовирусов при хранении в диапазоне приблизительно 2-8°C или при более высоких температурах, которые при этом также совместимы с парентеральным введением.

Предпосылки изобретения

Аденовирусные векторы считаются наиболее эффективными и широко распространенными средствами доставки генов. Существующей проблемой в области генной терапии и исследования вакцин является получение жидких составов на основе аденовирусов, которые способны стабилизировать эти вирусы в течение длительных периодов времени в приближенном к практике диапазоне температур для хранения фармацевтических препаратов, таком как приблизительно от 2 до приблизительно 8°C.

Биологическая активность аденовируса зависит от конформационной целостности, по меньшей мере, сердцевинной последовательности нуклеотидов, окруженной икосаэдральной структурой капсида, состоящей из капсидных белков. В отличие от традиционных органических и неорганических лекарственных средств, это весьма сложные биологические структуры, и незначительные химические или физические стресс-факторы могут способствовать разложению аденовирусной частицы. Соответственно определяющее значение имеет хороший состав на основе аденовирусных препаратов, обеспечивающий приемлемый срок годности, однако стабилизация этих векторов представляет определенные проблемы. Аденовирусы могут утрачивать эффективность вследствие физических факторов нестабильности, в том числе денатурации, агрегации (образования как растворимых, так и нерастворимых агрегатов), осаждения и адсорбции, а также химических факторов нестабильности, в том числе гидролиза, дезамидирования и окисления. Любой из этих путей разложения может приводить к снижению биологической активности, но потенциально также может приводить к образованию побочных продуктов или производных, обладающих повышенной токсичностью и/или измененной иммуногенностью.

Таким образом, необходим специализированный подход к нахождению надежного состава для аденовирусов, обеспечивающего стабильность в широком диапазоне условий. Тип буфера, pH и специальные наполнители необходимо будет тщательно оптимизировать для сохранения химической, физической и биологической стабильности аденовируса. С учетом всех факторов, которые могут изменяться, нахождение оптимальных условий для составления аденовирусов осложняется проблемами, и композиция хорошего состава является априори непредсказуемой.

Лиофилизированные составы существуют и являются стабильными. Однако они обычно бывают относительно дорогостоящими, требуют времязатратной обработки перед введением, и эффективность может в определенной степени утрачиваться в процессе лиофилизации. Существуют жидкие составы, стабильные в замороженном состоянии (-80°C), но они требуют специальной транспортировки и дорогостоящих хранилищ, что делает организацию надежной холодовой цепи практически невозможной, особенно на периферии торгово-распределительной сети. Предпочтительный состав для аденовирусов представляет собой, таким образом, жидкий состав, обеспечивающий стабильность аденовирусов в диапазоне температур 2-8°C или при более высоких температурах. Такой состав можно хранить в обычном холодильнике и можно вводить быстро и легко.

Жидкие составы для аденовирусов были описаны ранее, например в Evans et al. 2004. Представленными на примере лучшими составами в настоящей заявке являются составы с Tris-буфером, имеющие pH, варьирующий в диапазоне от 7,5 до 8,5. В настоящем описании было обнаружено, что указанные составы являются приближенно-оптимальными для аденовирусов. Составы для аденовирусов также раскрыты в WO 00/29024, которая главным образом относится к методикам лиофилизации. Другие составы для аденовирусов, содержащие полиол, упомянуты в WO 00/29024.

Соответственно в данной области техники существует необходимость нахождения составов, улучшающих стабильность аденовирусов путем сохранения количества и эффективности содержащихся в них аденовирусов при хранении в течение продолжительного периода времени. Стабильность аденовирусов также должна сохраняться в случае стресса, вызываемого перемешиванием при перевозке или сдвиговыми усилиями при получении или клиническом применении, а также в широком диапазоне климатических условий, в частности при повышенной температуре или после многократных циклов замораживания/размораживания. Дополнительно состав должен подходить для предполагаемого пути введения, должен хорошо переноситься и предпочтительно должен иметь композицию с как можно меньшим количеством компонентов. Целью настоящего изобретения является получение таких составов для аденовирусов.

Краткое описание изобретения

Авторы настоящего изобретения обнаружили и описали в настоящем описании составы для аденовирусов, улучшающие стабильность аденовирусов путем сохранения количества и эффективности (инфекционности), а также качества аденовирусов по сравнению с составами, раскрытыми ранее. Примечательно, что комбинация цитратного буфера, имеющего pH, варьирующий в диапазоне от 5,5 до 6,5, с

гидроксипропил-бета-циклодекстрином (НВCD) приводила к получению превосходного состава для сохранения количества, эффективности (инфекционности) и качества аденовирусов, тем самым улучшая общую стабильность аденовирусов по сравнению с другими составами, известными из уровня техники.

Как и в случае всех наполнителей, используемых для разработки состава, некоторые компоненты, присутствующие в составе согласно настоящему изобретению, по отдельности упоминаются в предшествующем уровне техники. Однако именно эта весьма конкретная комбинация нескольких компонентов придает составу по настоящему изобретению его превосходные свойства и стабилизирующий потенциал. Точный состав согласно настоящему изобретению не был раскрыт в предшествующем уровне техники. В дополнение, на основании предшествующего уровня техники в этой по своей природе непредсказуемой области нельзя было предвидеть, что указанный состав будет обеспечивать такую улучшенную стабильность аденовирусов.

Настоящее изобретение, таким образом, относится к стабилизированным составам на основе аденовирусов и родственным фармацевтическим препаратам, которые можно использовать, например, в генной терапии и/или путях применения в вакцинах.

Составы согласно настоящему изобретению содержат цитратный буфер при рН, варьирующем в диапазоне от 5,5 до 6,5, и дополнительно содержат гидроксипропил-бета-циклодекстрин (НВCD). Составы дополнительно содержат соль и неионогенный детергент. Составы согласно настоящему изобретению необязательно дополнительно содержат спирт с 2 или 4 атомами углерода. Составы на основе аденовирусов по настоящему изобретению подлежат длительному хранению при 2-8°C или $\leq -65^\circ\text{C}$ в течение более 6 месяцев, 1 года, 1,5 лет, 2 лет или более.

Составы на основе аденовирусов по настоящему изобретению содержат а) рекомбинантный аденовирус в б) растворе с цитратным буфером, который дополнительно содержит с) гидроксипропил-бета-циклодекстрин (НВCD); d) соль и е) неионогенный детергент. В целях сохранения стабильности аденовируса принципиально важно, чтобы рН этого состава варьировал в диапазоне от 5,5 до 6,5.

Состав согласно настоящему изобретению предпочтительно содержит аденовирус в титре, варьирующем в диапазоне от приблизительно 1×10^7 до 1×10^{13} в.ч./мл.

Согласно настоящему изобретению концентрация цитрата в составе варьирует в диапазоне от приблизительно 5 до 30 мМ.

Гидроксипропил-бета-циклодекстрин (НВCD) является предпочтительным криопротектором. НВCD присутствует в концентрации, варьирующей в диапазоне от 1 до 10% (вес./вес.).

Соль согласно изобретению представляет собой хлорид натрия (NaCl), присутствующий в концентрации, варьирующей в диапазоне от 20 до 200 мМ.

Неионогенный детергент согласно изобретению представляет собой полисорбат-80, имеющий концентрацию, варьирующую в диапазоне от 0,005 до 0,5% (вес./вес.).

В более предпочтительном варианте осуществления согласно настоящему изобретению состав имеет рН, варьирующий в диапазоне от приблизительно 5,7 до 6,3, и содержит цитрат в концентрации, варьирующей в диапазоне от 5 до 30 мМ; НВCD в концентрации, варьирующей в диапазоне от 1 до 10% (вес./вес.); NaCl в концентрации, варьирующей в диапазоне от 20 до 200 мМ; полисорбат-80 в концентрации, варьирующей в диапазоне от 0,01 до 0,05% (вес./вес.).

В другом предпочтительном варианте осуществления согласно настоящему изобретению состав имеет рН, варьирующий в диапазоне от приблизительно 5,8 до 6,2, и содержит цитрат в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 15 до 25 мМ; НВCD в концентрации, варьирующей в диапазоне от 3 до 8% (вес./вес.); NaCl в концентрации, варьирующей в диапазоне от 50 до 100 мМ; полисорбат-80 в концентрации, варьирующей в диапазоне от 0,01 до 0,03% (вес./вес.).

В еще более предпочтительном варианте осуществления состав согласно настоящему изобретению имеет рН приблизительно 6 и содержит цитрат в концентрации приблизительно 20 мМ; НВCD в концентрации приблизительно 5% (вес./вес.); NaCl в концентрации приблизительно 75 мМ; полисорбат-80 в концентрации приблизительно 0,02% (вес./вес.).

В настоящем описании было продемонстрировано, что спирт с 2 или 4 атомами углерода, в частности этанол, добавляемый в состав по настоящему изобретению, неожиданно обеспечивал существенную защиту аденовирусов от повреждения в ходе замораживания/размораживания и поэтому действовал в качестве криопротектора.

Таким образом, в предпочтительном варианте осуществления состав согласно настоящему изобретению дополнительно содержит спирт с 2 или 4 атомами углерода. В еще более предпочтительном варианте осуществления состав согласно настоящему изобретению содержит этанол. Концентрация этанола предпочтительно варьирует в диапазоне от 0,1 до 1% (вес./вес.).

В предпочтительном варианте осуществления согласно настоящему изобретению состав имеет рН, варьирующий в диапазоне от приблизительно 5,7 до 6,3, и содержит цитрат в концентрации, варьирующей в диапазоне от 5 до 30 мМ; НВCD в концентрации, варьирующей в диапазоне от 1 до 10% (вес./вес.); NaCl в концентрации, варьирующей в диапазоне от 2 до 200 мМ; полисорбат-80 в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 0,01 до 0,05% (вес./вес.); и этанол в концентрации,

варьирующей в диапазоне от приблизительно 0,2 до 0,6% (вес./вес.).

В другом предпочтительном варианте осуществления согласно настоящему изобретению состав имеет рН, варьирующий в диапазоне от приблизительно 5,8 до 6,2, и содержит цитрат в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 15 до 25 мМ; НВСД в концентрации, варьирующей в диапазоне от 3 до 8% (вес./вес.); NaCl в концентрации, варьирующей в диапазоне от 50 до 100 мМ; полисорбат-80 в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 0,01 до 0,03% (вес./вес.); и этанол в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 0,2 до 0,6% (вес./вес.).

В еще более предпочтительном варианте осуществления состав согласно настоящему изобретению имеет рН приблизительно 6 и содержит цитрат в концентрации приблизительно 20 мМ; НВСД в концентрации приблизительно 5% (вес./вес.); NaCl в концентрации приблизительно 75 мМ; полисорбат-80 в концентрации приблизительно 0,02% (вес./вес.) и этанол в концентрации приблизительно 0,4% (вес./вес.).

В другом предпочтительном варианте осуществления состав согласно настоящему изобретению имеет рН приблизительно 6 и содержит цитрат в концентрации приблизительно 20 мМ; НВСД в концентрации приблизительно 5% (вес./вес.); NaCl в концентрации приблизительно 80 мМ; полисорбат-80 в концентрации приблизительно 0,025% (вес./вес.) и этанол в концентрации приблизительно 0,4% (вес./вес.).

В еще более предпочтительном варианте осуществления состав согласно настоящему изобретению имеет рН приблизительно 6 и содержит цитрат в концентрации приблизительно 20 мМ; НВСД в концентрации приблизительно 5% (вес./вес.); NaCl в концентрации приблизительно 80 мМ; полисорбат-80 в концентрации приблизительно 0,025% (вес./вес.) и этанол в концентрации приблизительно 0,4% (вес./вес.).

В другом предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения составы представляют собой (замороженные) жидкие составы. В еще одном варианте осуществления составы по настоящему изобретению подходят для парентерального применения.

В одном варианте осуществления составы согласно настоящему изобретению содержатся во флаконе. В другом варианте осуществления составы содержатся в пакете или бутылки. В еще одном варианте осуществления составы содержатся в шприце или картридже.

Повышенная долгосрочная стабильность в широком диапазоне температур обуславливает увеличение срока годности составов на основе вирусов, раскрытых в настоящем описании, обеспечивая хранение и возможное введение этих составов реципиенту в течение периода, предпочтительно составляющего 1-2 года или более, при допустимых показателях утраты эффективности вируса (т.е. не более 0,3 log в два года при 2-8°C). В дополнение составы по настоящему изобретению демонстрируют стабильность при воздействии повышенных температур, продолжительных циклах замораживания/размораживания и перемешивании.

Описание фигур

Фиг. 1. Утрата (Δ) эффективности (в log ME/мл) Ad26 при повышенной температуре 25°C в составе В (незакрашенные ромбы) и контрольном составе (закрашенные кружки). Показана средняя Δ эффективности (n=4), отражающая эффективность_{образец, подвергнутый стрессу} - эффективность_{контрольный образец}. Эффективность измеряли с помощью QPA.

Фиг. 2. Утрата (Δ) эффективности (в log ME/мл) Ad35 при повышенной температуре 25°C в составе В (незакрашенные ромбы) и контрольном составе (закрашенные кружки). Показана средняя Δ эффективности (n=4), отражающая эффективность_{образец, подвергнутый стрессу} - эффективность_{контрольный образец}. Эффективность измеряли с помощью QPA.

Фиг. 3. Температурная точка плавления Ad26 в составе В и контрольном составе. Анализ ТМА (анализ температуры плавления) (n=3) для Ad26 проводили на образцах в t=0.

Фиг. 4. Температурная точка плавления Ad35 в составе В и контрольном составе. Анализ ТМА (анализ температуры плавления) (n=3) для Ad35 проводили на образцах в t=0.

Фиг. 5. Значения дельта-Ct (Δ Ct) Ad26 в составе В с NaCl, EDTA, этанолом и их комбинациями и без них через 69 дней при 25°C. Значения Δ Ct напрямую коррелируют с утратой эффективности, где большее число означает большую утрату эффективности.

Фиг. 6. Значения дельта-Ct (Δ Ct) Ad26 в составе В с NaCl, EDTA, этанолом и их комбинациями и без них через 16 дней при 35°C. Значения Δ Ct напрямую коррелируют с утратой эффективности, где большее число означает большую утрату эффективности.

Фиг. 7. Значения дельта-Ct (Δ Ct) Ad26 в составе В с NaCl, EDTA, этанолом и их комбинациями и без них спустя 30 циклов замораживания/размораживания с последующим перемешиванием в течение 1 дня. Значения Δ Ct напрямую коррелируют с утратой эффективности, где большее число означает большую утрату эффективности.

Фиг. 8. Турбидиметрия с измерением поглощения при 350 нм для Ad26 в составе В с NaCl, EDTA, этанолом и их комбинациями и без них в t=0 (закрашенные кружки), через 69 дней при 25°C (незакрашенные ромбы), через 16 дней при 35°C (закрашенные треугольники) и спустя 30 циклов замораживания/размораживания с последующим перемешиванием (незакрашенные прямоугольники).

Фиг. 9. Собственная флуоресценция Ad26 в составе В с NaCl, EDTA, этанолом и их комбинациями и без них в t=0 (закрашенные кружки), через 69 дней при 25°C (незакрашенные ромбы), через 16 дней

при 35°C (закрашенные треугольники) и спустя 30 циклов замораживания/размораживания с последующим перемешиванием (незакрашенные прямоугольники).

Фиг. 10. Температурная точка плавления Ad26 в составе F и контрольном составе. Анализ ТМА (n=3) для Ad26 проводили на образцах в t=0.

Фиг. 11. Парный график вероятности успеха для CQA эффективности (Δ предел эффективности $\geq -0,30 \log \text{ME/мл}$) в стрессовых условиях замораживание/размораживание (FT) + перемешивание (AG) + хранение при 35°C. Шкала вероятности успеха предусматривает значения от 0,4 (светло-серый) до 1 (черный). Исследуется вся экспериментальная область. В белом квадрате расположено проектное поле, предложенное на основании графика.

Подробное описание изобретения

Как упоминалось ранее, в данной области техники существует необходимость нахождения составов, улучшающих стабильность аденовирусов путем сохранения количества и эффективности содержащихся в них аденовирусов при хранении в течение продолжительного периода времени.

В некоторых литературных источниках раскрывается применение компонентов состава для аденовирусов. Altaras и соавторы раскрывают цитрат, входящий в большой перечень возможных ингибиторов свободнорадикального окисления. Указанный перечень также содержит комбинацию EDTA и этанола (EDTA/этанол), определяемую как дополнительный ингибитор свободнорадикального окисления. В составе по настоящему изобретению цитрат используется в качестве буфера, а не в качестве антиоксиданта.

Renteria и соавторы определяют гидроксипропил-бета-циклодекстрин (HBCD) как одну из добавок, используемых для содействия стабильности некоторых белков и во избежание агрегации при назальном введении. Renteria и соавторы раскрывают применение гидроксипропил-бета-циклодекстрина, усиливающего поглощение слизистой оболочкой, в аспекте состава, подходящего для назального введения. Все белки являются существенно отличными по сравнению с живыми вирусами, такими как аденовирусы, с точки зрения структуры, заряда и размера. Соответственно механизм стабилизации аденовирусов является совершенно отличным и непредсказуемым, если учитывать механизм стабилизации белков.

В WO 029024 раскрыт гидроксипропил-бета-циклодекстрин, входящий в большой перечень возможных лиопротекторов, используемых для получения высушенного сублимацией состава. WO 029024 относится к высушенной сублимацией 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 разбавления. Кроме того, увеличение масштаба способов лиофилизации может быть громоздкой попыткой.

Авторы настоящего изобретения обнаружили и описали в настоящем описании составы для аденовирусов, улучшающие стабильность аденовирусов путем сохранения количества и эффективности (инфекционности), а также качества аденовирусов по сравнению с составами, раскрытыми ранее.

Составы по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один рекомбинантный аденовирус. Конструирование аденовирусных векторов широко распространено в данной области 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) и Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), а также в других литературных источниках, упомянутых в настоящем описании. Вкратце, в аденовирусном векторе может иметь место дефицит по меньшей мере одного существенно важного функционального гена участка E1, например участка E1a и/или участка E1b аденовирусного генома, который требуется для вирусной репликации. Как известно специалисту в области получения аденовирусов, в случае делеций существенно важных участков генома аденовируса функции, за которые отвечают эти участки, должны обеспечиваться в транс-положении, предпочтительно клеткой-продуцентом, например путем интеграции в геном или в виде так называемых аденовирусов-помощников или плазмид-помощников при получении рекомбинантного аденовируса.

Размножение рекомбинантного аденовируса было подробно описано в патенте США 6492169 или в WO 03/104467, в патентах США №№ 5559099, 5837511, 5846782, 5851806, 5994106, 5994128, 5965541, 5981225, 6040174, 6020191 и 6113913, а также в Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", соответственно главы 67 и 68, в *Virology*, B. N. Fields et al., eds., 3d ed., Raven Press, Ltd., New York (1996), которые включены в данный документ посредством ссылки. Репликационно-дефектный аденовирусный вектор можно создать с помощью применения любого вида, штамма, подтипа или смеси видов, штаммов или подтипов аденовируса или химерного аденовируса в качестве источника векторной ДНК (см., например, WO 96/26281, WO 00/03029). 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 любые гибридные или мутантные серотипы 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 в себя, например, открытые рамки считывания трансгенов, например открытые рамки считывания, кодирующие полипептиды, иммунный ответ на которые является желаемым, если вектор используется в целях вакцинации, например трансгены, подходящие для формирования иммунного ответа на возбудителей малярии (см., например, WO 2004/055187), HIV, на возбудителей туберкулеза (см., например, WO 2006/053871), на некоторые вирусы и т.п., все из которых хорошо известны специалисту в данной области. В действительности природа трансгена не является критически важной для настоящего изобретения, он может представлять собой любую гетерологичную последовательность нуклеиновой кислоты и, следовательно, в данном случае не нуждается в дополнительном усовершенствовании.

Термин "стабильность", используемый в настоящем описании, относится к относительной устойчивости к разложению аденовирусных частиц в составе, сохраняющем их эффективность на временной шкале ожидаемой применимости. Эффективность предпочтительно демонстрирует снижение не более чем на 0,3 log в два года при 2-8°C.

Термин "эффективность", используемый в настоящем описании, относится к мере активности аденовируса, выраженной в инфекционных единицах, измеряемых в клеточном анализе эффективности, описанном далее в настоящем описании.

Композиция согласно настоящему изобретению демонстрирует снижение эффективности не более чем на 0,4 log в 60 дней и снижение титра не более чем на 0,3 log в 60 дней в ускоренном исследовании стабильности, каковое исследование проводят путем инкубирования составов при 25±2°C в течение 1-3 месяцев.

Композиция согласно настоящему изобретению также демонстрирует снижение эффективности не более чем на 0,2 log в 10 циклов в исследовании, где флаконы подвергают многократным циклам замораживания/размораживания с последующим перемешиванием в течение 24 ч при комнатной температуре в горизонтальной ориентации при 200 об/мин.

Под "фармацевтически приемлемым наполнителем" подразумевают любое инертное вещество, которое объединяют с активной молекулой, такой как вирус, для получения приемлемой или удобной лекарственной формы. "Фармацевтически приемлемый наполнитель" представляет собой наполнитель, который не является токсичным для реципиентов в используемых дозировках и концентрациях и является совместимым с другими ингредиентами состава, содержащего вирусный препарат. Примерами наполнителей являются криопротекторы, неионогенные детергенты, буферы, соли и ингибиторы свободнорадикального окисления.

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

Состав, улучшающий стабильность аденовирусов, также называемый "стабильным составом", как используется в настоящем описании, представляет собой состав, в котором аденовирус, по существу, сохраняет свою физическую и/или химическую целостность и/или биологическую эффективность при хранении в нем. Стабильность можно оценить путем определения различных характеристик, таких как количество (аденовируса в составе), эффективность и/или другие аспекты качества аденовируса в составе, в течение определенного периода времени и при определенных условиях хранения. Эти характеристики состава на основе аденовируса можно измерить при повышенных температурах (предсказательных для температур в реальном времени) или в других стрессовых условиях, например составы можно подвергать инкубированию при 25°C или подвергать циклам замораживания/размораживания и перемешиванию в целях изучения эффектов различных составов, максимально увеличивающих срок годности. Указанные характеристики, определяющие стабильность, можно определить с помощью по меньшей мере одного из способов, выбранных из группы, состоящей из визуального осмотра, количественной полимеразной цепной реакции вирусных частиц (vp-QPCR), анализа эффективности на основе QPCR (QPA), обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) и осаждения путем дифференциального центрифугирования (DCS), анализа температуры плавления (TMA), турбидиметрии и анализа собственной флуоресценции.

Количественная полимеразная цепная реакция вирусных частиц (vp-QPCR)

Vp-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 разложение специфичного флуоресцентного зонда, гибридизируемого в середине ампликона из 100 п.о. Зонд ковалентно связан со светоизлучающей молекулой и гасителем флуоресценции, и его разложение освобождает излучающую молекулу от гасителя флуоресценции с последующим флуоресцентным излучением 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, согласно методическим рекомендациям 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. Соответственно 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}). Значения Ct тестируемого материала откладывают на графике в зависимости от значений Ct калибровочной кривой, в результате чего получают достоверное и точное количество векторных частиц.

При использовании в качестве регистрируемых показателей после инкубирования на E1-компетентных клетках (QPA, см. ниже) более высокие значения дельта-Ct (с вычетом значений в $t=0$) будут происходить из более разложившихся образцов, а более низкие значения Ct 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 пропорционально начальной концентрации вируса в большом диапазоне множественности заражения (МОИ). Разведения образцов (не в конечной точке разведения) инокулируют на монослои клеток НЕК293 в 96-луночном планшете. Заражению позволяют продолжаться в течение 3 ч при 35°C. Среда из лунок аспирируют и замещают свежей средой, которая не содержит аденовирусы. Планшеты инкубируют в течение дополнительных 42 ч до клеточного лизиса с помощью раствора Triton X-100 и одной стадии замораживания/размораживания для высвобождения аденовирусной ДНК. QPCR проводят на разбавленных клеточных лизатах согласно способу, описанному выше. Титр инфекционности рассчитывают путем сравнения с калибровочной кривой, построенной по значениям Ct образца с известной инфекционностью, определяемой путем титрования в конечной точке. Альтернативно дельта эффективности может быть непосредственно выражена в значениях Ct, поскольку титр инфекционности, или эффективность, напрямую коррелирует со значениями Ct. В частности, для сравнения относительных различий в эффективности между составами это быстрый и надежный способ.

Обращенно-фазовая высокоэффективная жидкостная хроматография (RP-HPLC)

В целях определения некоторых аспектов качества аденовируса можно проанализировать белковые профили аденовирусов с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC). В HPLC разделяют компоненты смеси путем использования ряда химических взаимодействий между образцом, подвижной фазой (буфером или растворителем) и неподвижной фазой (хроматографическим наполнителем в колонке). Насос высокого давления перемещает подвижную фазу по колонке, а датчик показывает значения времени удерживания (t_R ; время между вводом образца и появлением максимума пика) молекул путем выявления поглощения UV-излучения при 280 нм. Разделение в RP-HPLC основано на различиях в гидрофобности. Неполярная неподвижная фаза образована гидрофобными алкильными цепями (длины цепей: C4, C8 и C18). Полярная подвижная фаза представляет собой воду с 0,1% трифторуксусной кислотой (TFA). Соединения, связываемые на колонках, элюируют с использованием повышающейся концентрации ацетонитрила с 0,1% TFA. Как правило, анализ с большей площадью гидрофобной поверхности характеризуется большим временем удерживания, тогда как наличие полярных групп уменьшает время удерживания. Типичный профиль аденовируса по RP-HPLC состоит из 10 или 14 белков, включающих сердцевинный белок (VII), основание пептона (III) и гексон (II).

Осаждение путем дифференциального центрифугирования (DCS)

DCS представляет собой способ определения распределения частиц по размеру (агрегации) путем осаждения. В дисковой центрифуге частицы осаждают в градиенте сахарозы (известной вязкости и плотности) под действием больших сил гравитации согласно закону Стокса. Скорость осаждения увеличивается пропорционально квадрату диаметра частицы, так что частицы, отличающиеся по размеру всего лишь на несколько процентов, осаждаются со значительно отличающимися скоростями. Время, необходимое для того, чтобы достигнуть датчика, используется для расчета размера частиц. Диапазон измерений для данного способа составляет приблизительно 0,02-30 мкм.

Анализ температуры плавления (ТМА)

Анализ температуры плавления (ТМА) можно использовать для определения температуры плавления (T_m) аденовируса в экспериментальных составах, которая является температурой, при которой происходит денатурация вирусного капсида. Этот распад вирусов можно измерить в режиме реального времени с использованием интеркалирующего флуоресцентного красителя для dsDNA. Данный флуоресцентный краситель дает сигнал флуоресценции, только будучи связанным с ДНК, которая высвобождается, когда вирусная частица распадается. Экспоненциальное усиление флуоресценции при плавлении капсида можно измерить с помощью типичного прибора для QPCR в ходе поэтапного повышения температуры. Образцы разбавляют до одной и той же концентрации (диапазон составляет 4×10^9 до 1×10^{12} в.ч./мл) в конкретных составах и смешивают с красителем SYBR зеленым (в 1X конечной концентрации) в объеме 50 мкл. Температуру повышают на $0,5^\circ\text{C}$ в 30 с, начиная с 30°C и до 79°C . На основании необработанных данных о флуоресценции вычисляют первую и вторую производные, и температуру плавления считывают в точке пересечения графика второй производной с осью x. Более высокие температуры плавления (T_m) могут свидетельствовать о том, что состав является более стабилизирующим.

Анализ мутности

В турбидиметрии измеряют потерю интенсивности проходящего света вследствие рассеяния частицами в образцах (видимое поглощение), выявляемую при длине волны, при которой молекулы в образце не поглощают свет (т.е. 350 нм для образцов, в которых белки являются основными хромофорами). Если молекулы агрегируют или образуют супрамолекулярные комплексы, рассеяние света, которое было беспорядочным, когда происходило на отдельных частицах, теперь становится когерентным, и, таким образом, измеряемая интенсивность возрастает. Это делает рассеяние света и турбидиметрию применимыми методиками для выявления агрегации и образования или диссоциации комплексов.

В анализе мутности образцы переносят в трех повторностях в UV-проницаемый плоскодонный микропланшет. Планшет закрывают UV-проницаемой герметичной крышкой. Спектры поглощения регистрируют с помощью ридера для микропланшетов от 230 до 500 нм, и поглощение при 975 нм измеряют для определения различий в длине оптического пути и возможного введения поправки на них. Контрольные образцы, состоящие из составов без аденовируса, при необходимости включают в анализ для введения поправки на рассеивающие или поглощающие матричные компоненты. Видимое поглощение при 350 нм применяют в качестве количественной меры мутности.

Анализ мутности характеризует стабильность образцов аденовирусов. Агрегация вируса приводит к увеличению мутности, а диссоциация капсида приводит к уменьшению мутности. Величина погрешности анализа составляет $<5\%$ (% CV) при значениях мутности >1 NTU.

Полученную мутность образцов, подвергнутых стрессу, всегда следует сравнивать с таковой у контрольных образцов. Поскольку увеличение или уменьшение после приложенного стресса зависит от пути разложения и специфично для каждого активного фармацевтического ингредиента (API), его нельзя предсказать. Изменение (усиление или снижение) по сравнению с образцами в $t=0$ свидетельствует о меньшей стабильности состава. Ожидается, что подвергнутые стрессу образцы, сравнимые с образцами в $t=0$, будут более стабильными.

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 UV-проницаемый плоскодонный микропланшет. Планшет закрывают UV-проницаемой герметичной крышкой. Флуоресценцию триптофана измеряют с помощью ридера для микропланшетов 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 стабильности 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 разложения 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 наиболее стабильными.

Аденовирус "сохраняет свою физическую стабильность" в фармацевтическом составе, если он, среди прочего, проявляет минимальную утрату (т.е. $0,3 \log/2$ года) в том, что касается количества и эффективности, и не демонстрирует существенных модификаций белков. Дополнительно при визуальном изучении не должно наблюдаться никаких признаков агрегации, осаждения, изменения цвета и/или прозрачности.

"Приблизительно", как используется в настоящей заявке, означает $\pm 10\%$, если не указано иное.

Настоящее изобретение относится к составам, стабилизирующим аденовирусы, и к родственным фармацевтическим препаратам, предпочтительно для применения в генной терапии и/или путях применения в вакцинах. Предпочтительный стабилизированный состав, содержащий вирус, раскрытый в настоящем описании, представляет собой жидкий состав на основе аденовируса, который демонстрирует улучшенную стабильность аденовируса при хранении в диапазоне приблизительно $2-8^\circ\text{C}$, при этом также будучи совместимым с парентеральным введением. Эти составы можно, однако, также хранить при более низких температурах, например -20°C или ниже, -40°C или ниже, -65°C или ниже, -80°C или ниже. Они также могут быть более стабильными при температурах выше 8°C , например составляющих 25°C или даже более высоких.

Эти составы, способные стабилизировать аденовирус, содержат цитратный буфер, гидроксипропил-бета-циклодекстрин (HBCD), соль и неионогенный детергент, а также необязательные дополнительные компоненты, повышающие стабильность добавляемого вируса. pH указанного буфера находится между 5,5 и 6,5.

Составы по настоящему изобретению обеспечивают стабильность аденовирусов при различных концентрациях вирусов, моно- или поливалентных, и могут вводиться различным позвоночным организмам, предпочтительно млекопитающим, и в частности людям. Стабилизированные составы на основе вирусов по настоящему изобретению представляют собой композиции на основе аденовирусов, которые можно, например, вводить в виде вакцины, которая может предоставлять профилактическое преимущество ранее не инфицированным индивидуумам и/или обеспечивать терапевтический эффект.

Предпочтительным аспектом настоящего изобретения является состав для рекомбинантных аденовирусов (т.е. аденовирусов, содержащих целый трансген или его часть, экспрессируемые у целевого реципиента после введения реципиенту, как, например, в любой методике, основанной на генной терапии или генной вакцинации у млекопитающих/людей, доступной специалисту в данной области), демонстрирующий улучшенные характеристики стабильности, описанные в настоящем описании, с концентрацией вируса в диапазоне от приблизительно 1×10^7 в.ч./мл (вирусных частиц/мл) до приблизительно 1×10^{13} в.ч./мл. Более предпочтительный диапазон составляет от приблизительно 1×10^9 до 1×10^{13} в.ч./мл, при этом особенно предпочтительная концентрация вируса составляет от приблизительно 1×10^{10} до 5×10^{12} в.ч./мл. Терапевтические или профилактические композиции составов по настоящему изобретению можно вводить индивидууму в количествах, достаточных для лечения или предупреждения соответствующего нарушения. Эффективное количество для введения человеку может, разумеется, варьировать в зависимости от различных факторов, таких как состояние, масса, пол и возраст индивидуума. Другие факторы включают способ введения. В предпочтительном варианте осуществления составы по настоящему изобретению подходят для парентерального применения.

Составы по настоящему изобретению представляют собой растворы с цитратным буфером, имеющие pH, варьирующий в диапазоне от 5,5 до 6,5, дополнительно содержащие гидроксипропил-бета-циклодекстрин (HBCD) и необязательно содержащие спирт с двумя или четырьмя атомами углерода. Указанная комбинация неожиданно оказалась превосходным составом для сохранения количества, эффективности (инфекционности) и качества аденовирусов, как продемонстрировано в настоящем описании.

В предпочтительном варианте осуществления концентрация цитрата варьирует в диапазоне от приблизительно 5 до 30 мМ, например от приблизительно 5 до 25 мМ, например, от приблизительно 10 до 25 мМ, например составляет приблизительно 20 мМ.

Другим существенным компонентом в этих составах, способствующим стабилизации вируса в больших диапазонах температур и в течение продолжительных периодов хранения, является HBCD, применяемый в качестве криопротектора. В предпочтительном варианте осуществления концентрация HBCD варьирует в диапазоне от приблизительно 1 до 10% (вес./вес.), например от приблизительно 3 до 8% (вес./вес.), например от приблизительно 4 до 6% (вес./вес.), например составляет приблизительно 5% (вес./вес.).

Дополнительным компонентом составов по настоящему изобретению является соль. Соль повышает стабильность вирусов. Целями включения соли в состав являются достижение желаемой ионной силы или осмоляльности и дополнительная оптимизация электростатических взаимодействий. Соль присутствует при осмоляльности, физиологически приемлемой для реципиента. Вклад в ионную силу могут вносить ионы, образуемые буферным соединением, а также ионы небуферных солей. Соли, подходящие для составов по настоящему изобретению, включают без ограничения хлорид натрия (NaCl), хлорид кальция (CaCl_2) или хлорид марганца (MnCl_2). В противоположность предшествующему уровню техники было

показано, что хлорид магния ($MgCl_2$) отрицательно влияет на стабильность аденовирусов. Следовательно, в предпочтительном варианте осуществления состав согласно настоящему изобретению не содержит хлорид магния.

В предпочтительном варианте осуществления состав на основе вируса согласно настоящему изобретению содержит хлорид натрия ($NaCl$). В предпочтительном варианте осуществления концентрация хлорида натрия варьирует в диапазоне от приблизительно 10 до 250 мМ, например от приблизительно 20 до 200 мМ, например от приблизительно 30 до 150 мМ, например от приблизительно 50 до 100 мМ, например составляет приблизительно 80 мМ.

Составы по настоящему изобретению содержат по меньшей мере один неионогенный детергент (также называемый неионогенным поверхностно-активным веществом), добавляемый для уменьшения адсорбции на поверхностях контейнера, а также для возможного обеспечения повышения стабилизации вируса (например, путем уменьшения агрегации). Неионогенные детергенты для применения в составах по настоящему изобретению включают без ограничения полиоксиэтиленовые сложные эфиры жирных кислот и сорбита, в том числе без ограничения полисорбат-80 (Tween 80®), полисорбат-60 (Tween 60®), полисорбат-40 (Tween 40®) и полисорбат-20 (Tween 20®), а также неионогенные поверхностно-активные вещества серии Pluronic (например, Pluronic 121).

В предпочтительном варианте осуществления концентрации неионогенного детергента варьирует в диапазоне от приблизительно 0,001 до 1% (вес./вес.), например от приблизительно 0,005 до 0,5% (вес./вес.), например от приблизительно 0,01 до 0,1% (вес./вес.), например от приблизительно 0,01 до 0,05% (вес./вес.), например от приблизительно 0,015 до 0,03% (вес./вес.), например составляет приблизительно 0,025% (вес./вес.).

В предпочтительном варианте осуществления состав на основе вируса согласно настоящему изобретению содержит полисорбат-80. Концентрация полисорбата-80 предпочтительно варьирует в диапазоне от приблизительно 0,001 до 1% (вес./вес.), например от приблизительно 0,005 до 0,5% (вес./вес.), например от приблизительно 0,01% до 0,1% (вес./вес.), например от приблизительно 0,01 до 0,05% (вес./вес.), например от приблизительно 0,015 до 0,03% (вес./вес.), например составляет приблизительно 0,025% (вес./вес.).

В предпочтительном варианте осуществления состав на основе вируса согласно настоящему изобретению дополнительно содержит EDTA. В более предпочтительном варианте осуществления концентрация EDTA варьирует в диапазоне от приблизительно 0,05 до 0,2 мМ, например от приблизительно 0,05 до 0,15 мМ, например от приблизительно 0,08 до 0,12 мМ, например составляет приблизительно 0,1 мМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления состав на основе вируса согласно настоящему изобретению дополнительно содержит этанол. В более предпочтительном варианте осуществления концентрация этанола варьирует в диапазоне от приблизительно 0,1 до 1% (вес./вес.), например от приблизительно 0,2 до 0,8% (вес./вес.), например от приблизительно 0,2 до 0,6% (вес./вес.), например составляет приблизительно 0,4% (вес./вес.).

В предпочтительном варианте осуществления, если состав на основе вируса согласно настоящему изобретению содержит этанол, он не обязательно должен в то же самое время содержать EDTA.

С учетом вышеприведенного обсуждения настоящего изобретения относится к составу, содержащему аденовирус, такой как рекомбинантный Ad5, Ad26 или Ad35, который можно, например, использовать в генной терапии и/или путях применения в генной вакцинации, демонстрирующему улучшенные свойства стабильности по сравнению с наиболее эффективным составом, известным из уровня техники (раскрытым в Evans et al. 2004), и содержащему по меньшей мере цитратный буфер, HBCD в качестве криопротектора, соль и поверхностно-активное вещество.

Конкретный вариант осуществления настоящего изобретения относится к такому составу на основе рекомбинантного аденовируса, который забуферен цитратом до pH, варьирующего в диапазоне от 5,5 до 6,5, и дополнительно содержит гидроксипропил-бета-циклодекстрин (HBCD), соль, неионогенный детергент и спирт с 2 или 4 атомами углерода.

В предпочтительном варианте осуществления согласно настоящему изобретению состав содержит цитратный буфер с pH, варьирующим в диапазоне от приблизительно 5,5 до 6,5, содержит HBCD в качестве криопротектора, $NaCl$ в качестве соли, полисорбат-80 в качестве поверхностно-активного вещества и спирт с 2 или 4 атомами углерода в качестве дополнительного принципиально нового криопротектора.

В другом предпочтительном варианте осуществления согласно настоящему изобретению состав содержит цитратный буфер с pH, варьирующим в диапазоне от приблизительно 5,5 до 6,5, содержит HBCD в качестве криопротектора, $NaCl$ в качестве соли, полисорбат-80 в качестве поверхностно-активного вещества и EDTA.

В другом предпочтительном варианте осуществления согласно настоящему изобретению состав содержит цитратный буфер с pH, варьирующим в диапазоне от приблизительно 5,5 до 6,5, содержит HBCD в качестве криопротектора, $NaCl$ в качестве соли, полисорбат-80 в качестве поверхностно-активного вещества и этанол в качестве дополнительного принципиально нового криопротектора.

В другом предпочтительном варианте осуществления согласно настоящему изобретению состав содержит цитратный буфер с pH, варьирующим в диапазоне от приблизительно 5,5 до 6,5, содержит HBCD

в качестве криопротектора, NaCl в качестве соли, полисорбат-80 в качестве поверхностно-активного вещества. Данный состав дополнительно содержит этанол и не содержит EDTA.

В предпочтительном варианте осуществления согласно настоящему изобретению состав имеет pH, варьирующий в диапазоне от приблизительно 5,9 до 6,2, и содержит цитрат в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 10 до 25 мМ; HBCD в концентрации, варьирующей в диапазоне от 4 до 6% (вес./вес.); NaCl в концентрации, варьирующей в диапазоне от 70 до 100 мМ; полисорбат-80 в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 0,018 до 0,035% (вес./вес.); и этанол в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 0,3 до 0,45% (вес./вес.).

В другом предпочтительном варианте осуществления согласно настоящему изобретению состав имеет pH, варьирующий в диапазоне от приблизительно 5,8 до 6,2, и содержит цитрат в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 15 до 25 мМ; HBCD в концентрации, варьирующей в диапазоне от 3 до 8% (вес./вес.); NaCl в концентрации, варьирующей в диапазоне от 50 до 100 мМ; полисорбат-80 в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 0,01 до 0,03% (вес./вес.); и EDTA в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 0,05 до 0,15 мМ.

В другом предпочтительном варианте осуществления согласно настоящему изобретению состав имеет pH, варьирующий в диапазоне от приблизительно 5,9 до 6,2, и содержит цитрат в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 10 до 25 мМ; HBCD в концентрации, варьирующей в диапазоне от 4 до 6% (вес./вес.); NaCl в концентрации, варьирующей в диапазоне от 70 до 100 мМ; полисорбат-80 в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 0,018 до 0,035% (вес./вес.); и EDTA в концентрации, варьирующей в диапазоне от приблизительно 0,05 до 0,15 мМ.

В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения состав забуферен приблизительно 20 мМ цитратом до pH приблизительно 6; HBCD присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 5% (вес./вес.); NaCl присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 80 мМ; поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат-80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,025% (вес./вес.); и EDTA присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 0,1 мМ.

В еще более предпочтительном варианте осуществления настоящего изобретения состав забуферен приблизительно 20 мМ цитратом до pH приблизительно 6; HBCD присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 5% (вес./вес.); NaCl присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 80 мМ; поверхностно-активное вещество представляет собой полисорбат-80 в концентрации, составляющей приблизительно 0,025% (вес./вес.); и этанол присутствует в концентрации, составляющей приблизительно 0,4% (вес./вес.). Дополнительно можно использовать комбинации вышеупомянутых факторов.

В одном варианте осуществления составы согласно настоящему изобретению содержатся во флаконе, таком как, например, флакон DIN 2R из боросиликатного стекла типа I. В другом варианте осуществления составы содержатся в пакете. Пакеты, содержащие составы по настоящему изобретению, могут иметь в своем составе слои, изготовленные из, например, сополимера этилена и винилацетата (EVA) или этилвинилового спирта (EVOH). В еще одном варианте осуществления настоящего изобретения составы содержатся в шприце.

Составы на основе рекомбинантных вирусов, описанные в настоящем описании, можно вводить позвоночному реципиенту (предпочтительно реципиенту-млекопитающему, и в частности реципиенту-человеку) любым способом, известным из уровня техники. Эти пути доставки включают без ограничения внутримышечную инъекцию, внутрибрюшинную инъекцию, внутривенную инъекцию, ингаляцию или интраназальную доставку, пероральную доставку, сублингвальное введение, подкожное введение, трансдермальное введение, внутрикожное введение, введение в протоки слюнных желез, транскутанное введение или перкутанное введение. В предпочтительном варианте осуществления состав по настоящему изобретению совместим с парентеральным введением.

В соответствии с составами, раскрытыми в настоящем описании, настоящее изобретение также относится к способам сохранения аденовируса, включающим получение составов, содержащих вирусы, раскрытых в настоящем описании, каковые составы обуславливают улучшение стабильности вирусов при хранении при -65°C и в диапазоне приблизительно $2-8^{\circ}\text{C}$, а также, возможно, при более высоких температурах, при этом также будучи совместимыми с парентеральным введением, в частности с парентеральным введением людям.

Таким образом, другой аспект настоящего изобретения относится к способам сохранения аденовируса, включающим получение состава, раскрытого в настоящем описании, и хранение указанного состава при температуре, варьирующей в диапазоне от 2 до 8°C .

Следующие примеры представлены для иллюстрации настоящего изобретения без, однако, его ограничения в настоящем описании.

Примеры

Пример 1.

План и методика проведения эксперимента.

После тестирования нескольких различных составов один состав превосходил другие. Этот новый

состав был назван "составом В" и содержал 5% (вес./вес.) HBCD, 20 мМ цитрат, 0,02% (вес./вес.) PS-80 и 75 мМ NaCl при pH 6,0.

Для двух аденовирусных (Ad35.TB-S и Ad26.Mosl.Gag-Pol) препаратов (одного, содержащего аденовирус серотипа 35 (Ad35), и одного, содержащего аденовирус серотипа 26 (Ad26)) производили замену буфера с использованием колонок PD-10 (GE Healthcare) в составе В.

Оба аденовирусных препарата также составляли в "контрольный состав", который был описан в Evans et al. 2004 и который был лучшим составом, доступным до сих пор. Указанный "контрольный состав" содержал 10 мМ Tris, 10 мМ гистидин, 1 мМ MgCl₂, 75 мМ NaCl, 5% (вес./вес.) сахарозы, 0,02% (вес./вес.) PS-80, 0,1 мМ EDTA, 0,4% (вес./вес.) EtOH при pH 7,4.

На каждый состав применяли 12 колонок; элюаты объединяли, подвергали стерилизующей фильтрации и хранили при 2-8°C в стеклянной бутылке. Образцы отбирали для определения титра вируса с помощью qPCR, и все титры доводили с помощью соответствующего буферного состава до $1,7 \times 10^{11}$ в.ч./мл. Затем составы заливали в стеклянные флаконы (0,7 мл на флакон), которые закупоривали и закрывали колпачками.

Образцы в t=0 (контрольные, 6 флаконов на группу) хранили непосредственно при $\leq -65^\circ\text{C}$. Затем шесть флаконов на группу (n=6) инкубировали при 25°C и замораживали при $\leq -65^\circ\text{C}$ в t=10, 20, 30, 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80 и 90 дней до проведения анализа образцов с помощью QPA в трех повторностях на образец.

В дополнение образцы в t=0 для векторов в обоих составах анализировали с помощью TMA (анализ температуры плавления) для определения температуры плавления капсида. Более высокая температура плавления коррелирует с более высокой термостабильностью вирусного капсида. Образцы в конечной точке (t=90 дней) также анализировали с помощью обращенно-фазовой высокоэффективной жидкостной хроматографии (RP-HPLC) и осаждения путем дифференциального центрифугирования (DCS) и сравнивали с контрольными образцами в t=0.

Результаты и выводы.

После завершения исследования все образцы анализировали с помощью QPA, и утрату эффективности выражали в виде дельты путем вычитания значений в t=0. Состав В согласно настоящему изобретению (незакрашенные ромбы) значительно ($p=1,44E-05$) превосходил контрольный состав (закрашенные кружки), что обуславливало меньшее ухудшение эффективности с течением времени и более длительный предполагаемый срок годности (табл. 1) для обоих аденовирусов (фиг. 1 и 2). С помощью Statistical Analysis System (программного обеспечения SAS) к данным об эффективности были подобраны линейная (Ad26) и квадратическая (Ad35) модели с использованием времени и квадрата времени в качестве фиксированных эффектов. Если фиксированный эффект 'time' представляет линейное снижение эффективности, то фиксированный эффект 'time*time' представляет кривизну этого снижения. Оба эффекта использовали в модели для оценки их значимости. Информационный критерий Акаике (AIC) является мерой относительного качества статистической модели, учитывающей сложность модели и точность ее подбора. Чем меньше AIC, тем лучше подобрана модель. В линейной модели угол наклона представляет скорость ухудшения эффективности. Путем сравнения углов наклона можно идентифицировать лучший буфер (с наименьшим углом наклона).

Сроки годности соответствуют моментам времени, в которых нижний предел данного интервала удовлетворяет указанному техническому требованию (т.е. снижению эффективности). В случае квадратической модели для вычисления срока годности брали двусторонние 95% доверительные интервалы вокруг среднего. Сохранение только нижней границы для оценки срока годности обуславливало 97,5% уровень доверия для нижнего доверительного интервала в одномерном случае. Значения в точках пересечения с осями координат (отражающие эффективность в t=0) усредняли и исключали из необработанных данных и модели. Сроки годности вычисляли для обоих составов.

Таблица 1. Сроки годности при 25°C, полученные в результате статистического анализа кривых ухудшения эффективности (фиг. 1 и 2)

	Состав В по сравнению с контрольным
Ad26 - срок годности	На 36,1% более длительный
Ad35 - срок годности	На 50,0% более длительный

RP-HPLC не показала никаких признаков модификаций или окисления белков аденовирусов. DCS не выявило никаких признаков агрегации. Кроме того, состав согласно настоящему изобретению обуславливал значительное повышение температуры плавления как для Ad26 (фиг. 3), так и для Ad35 (фиг. 4) по сравнению с контрольным составом, что указывает на повышенную стабильность аденовирусов в составе В.

Пример 2.

План и методика проведения эксперимента.

После проведения экспериментов, описанных в примере 1, состав В модифицировали путем добавления или исключения одного из нескольких компонентов (NaCl, этанола, EDTA или их комбинаций) с получением 8 экспериментальных составов (А-Н, см. табл. 2), которые сравнивали с контрольным составом (описанным в Evans et al. и указанным в настоящем описании выше). Все составы содержат 5% HBCD, 20 мМ цитрат и 0,02% PS-80. Как указано в табл. 2, составы дополнительно содержат 75 мМ NaCl, 0,1 мМ EDTA и/или 0,5% этанол (EtOH). Аденовирусы (Ad26) инкубировали в этих 9 составах в течение 69 дней при 25°C или 16 дней при 35°C или подвергали 30 циклам замораживания/размораживания с последующим перемешиванием (1 день при комнатной температуре). Утрату эффективности оценивали с помощью QPA и выражали в виде значений дельта-Ct (пороговый цикл) (с учетом значений в t=0). Дополнительно значение поглощения при 350 нм считывали в качестве меры мутности, и собственную флуоресценцию измеряли для выявления конформационных изменений белков и агрегации. В заключение проводили TMA и $\nu\text{-QPCR}$ для определения температуры плавления и соотношения в.ч./МЕ.

Таблица 2. Композиция состава; все составы содержат 5% HBCD, 20 мМ цитрат и 0,02% PS-80, некоторые дополнены NaCl - 75 мМ, EDTA - 0,1 мМ и/или этанолом (EtOH) - 0,5% (вес./вес.)

Состав	NaCl	EDTA	EtOH
А	-	-	-
В	+	-	-
С	-	+	-
Д	+	+	-
Е	-	-	+
F	+	-	+
Г	-	+	+
Н	+	+	+

Результаты и выводы.

Исходя из результатов исследования стабильности при 25°C, показанных на фиг. 5, можно сделать вывод, что добавление NaCl в комбинации с EDTA (С и D) или этанолом (Е и F) явно благоприятно для стабильности вируса, при этом этанол явно превосходит EDTA. Комбинация обоих из EDTA и этанола с или без NaCl неожиданно не приводит к получению более стабильного состава (G и H). Это противоречит тому, чего можно было ожидать на основании предшествующего уровня техники, например Altaras et al., 2005 и Evans et al. 2004, где конкретная комбинация EDTA/EtOH обычно упоминается как ингибитор свободнорадикального окисления и вследствие этого как средство, значительно повышающее стабильность аденовирусов.

При переходе к модели с более жесткими условиями, 35°C в течение 16 дней, дискриминационная способность становится более явно выраженной, как можно видеть на фиг. 6. Добавление NaCl явно улучшает стабильность, и благоприятный эффект этанола подтверждается на фиг. 6. На удивление, комбинация EDTA вместе с этанолом с или без NaCl оказывала явно отрицательный эффект на стабильность вируса. Это идет вразрез с распространенным мнением, что комбинация EDTA/EtOH эффективна в качестве ингибитора свободнорадикального окисления (например, Altaras et al. 2005 и Evans et al. 2004). В совокупности для обоих тепловых стресс-факторов показан благоприятный эффект NaCl в комбинации с EDTA либо этанолом в данном конкретном составе.

Для исследования функциональных характеристик составов с другим путем разложения указанные составы (А-Н) подвергали циклу замораживания/размораживания и стрессу, вызываемому перемешиванием (фиг. 7). Наблюдаемые эффекты были как явно выраженными, так и неожиданными. EDTA (С и D) явно не оказывала какой-либо эффект. В то же время этанол обеспечивал существенную защиту от повреждения в ходе замораживания/размораживания и поэтому действовал в качестве криопротектора (Е-Н).

Эти непредвиденные результаты были подтверждены показаниями поглощения при 350 нм в турбидиметрическом анализе (фиг. 8). Замораживание/размораживание (незакрашенные квадраты на фиг. 8) приводило к уменьшению мутности по сравнению с t=0 в составах без этанола. Это снижение наиболее вероятно было обусловлено распадом вирусных частиц. С данными наблюдениями согласуется то, что стресс, вызываемый повышенными температурами (черные треугольники на фиг. 8), также приводил к уменьшению мутности в составах, не содержащих этанол, тогда как в составе с этанолом, в частности в составе F, не проявлялись значительные изменения по сравнению с образцами в t=0 (черные кружки на фиг. 8).

В дополнение, собственная флуоресценция (фиг. 9) дополнительно подтверждает предыдущие наблюдения. Состав без этанола обуславливал значительное ослабление флуоресценции триптофана после стресса, вызываемого замораживанием/размораживанием, по сравнению с t=0 (незакрашенные квадраты

на фиг. 9), что свидетельствует о серьезных конформационных изменениях в вирусном капсиде. Резко контрастирует с этим то, что составы с этанолом защищают вирус от этого стресс-фактора. Тепловой стресс оказывал лишь незначительное влияние на составы, содержащие этанол.

По данным ТМА выявили значительное повышение температуры плавления состава F по сравнению с контрольным составом (фиг. 10), что свидетельствует о большей стабильности вирусного капсида в составе F.

Важно, что в контрольном составе по сравнению с составом F были выявлены более высокие значения (меньшее количество инфекционных частиц на общее количество частиц) соотношения в.ч./МЕ, отражающего относительный показатель инфекционности вирусного препарата (свидетельствующий о качестве вирусных частиц), после воздействия повышенной температуры (25°C), см. табл. 3. Это показывает, что состав F способен сохранять инфекционность аденовирусов значительно лучше по сравнению с контрольным составом.

Таблица 3. Соотношения в.ч./МЕ для состава F и контрольного состава в t=0 и t=61 при 25°C

	Не подвергнутый стрессу	Подвергнутый стрессу
Контрольный состав	39	93
Состав F	32	61

Пример 3.

План и методика проведения эксперимента.

Для определения проектного поля буфера для состава оценивали диапазон надежности каждого наполнителя. После выбора факторов для каждого компонента был определен экспериментальный диапазон, представленный в табл. 4.

Для картирования экспериментального пространства следовали подходу планирования эксперимента (DOE). Используя план с низким и высоким уровнем для каждого из шести факторов (табл. 4), получали 15 составов - в том числе три центральные точки - для исследования эффекта каждого фактора и возможных взаимодействий между факторами (табл. 5) с высокой статистической мощностью.

Таблица 4. Факторы и уровни, применяемые для формирования экспериментального пространства для исследования

Фактор состава - буфер F		Целевой уровень в буфере F для состава	Низкий уровень	Высокий уровень
Состав буфера	pH	6,0	5,8	6,2
	Цитрат (мМ)	20	10	25
	HBCD (вес/вес)	5	3	6
	EtOH (вес/вес)	0,4	0,3	0,5
	PS-80 (вес/вес)	0,02	0,015	0,04
	NaCl (мМ)	75	50	100

Таблица 5. План эксперимента: независимо получали пятнадцать составов, в том числе три центральные точки (серые строки), в соответствии с факторами и уровнями, применяемыми для формирования экспериментального пространства для исследования

Название	pH	Цитрат	HBCD	EtOH	PS-80	NaCl	Комментарии
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	Центральная точка
F-03	6	10	3	0,3	0,015	50	
F-00.2	6	20	5	0,4	0,02	75	Центральная точка
F-04	6	25	6	0,5	0,04	100	
F-00.3	6	20	5	0,4	0,02	75	Центральная точка
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	

Для определения подходящих уровней каждого наполнителя и pH (надежности состава) каждую группу заливали в стеклянные флаконы и подвергали 10 циклам замораживания/размораживания (F/T) с последующим перемешиванием в течение 1 дня при 200 об/мин, при комнатной температуре (RT) и хранением в течение 7 дней при 35°C (модель ускоренного разложения). Эффективность согласно QPA (n=3) затем применяли в качестве регистрируемого показателя.

Для препарата Ad26 производили замену буфера с использованием колонок PD-10 (GE Healthcare) в каждом из составов, перечисленных в табл. 5. Элюаты каждого состава объединяли, подвергали стерилизующей фильтрации и хранили при 2-8°C в стеклянной бутылке. Образцы отбирали для определения титра вируса с помощью vp-QPCR, и все титры доводили с помощью соответствующего состава до 1×10^{11} в.ч./мл. Затем составы заливали в стеклянные флаконы (0,75 мл на флакон), которые закупоривали и закрывали колпачками. Образцы в t=0 (контроль, 6 флаконов на группу) хранили непосредственно при $\leq -65^\circ\text{C}$. Затем четыре флакона на группу (n=4) инкубировали при замораживании/размораживании, подвергали перемешиванию и хранили при 35°C в течение 7 дней (табл. 6) до проведения анализа образцов с помощью QPA в трех повторностях на образец.

Результаты и выводы.

После завершения исследования все образцы анализировали с помощью QPA, и утрату эффективности выражали в виде дельты путем вычитания значений в t=0. Эти данные использовали для статистического анализа.

Результатом статистического анализа была вероятность успеха, для которой успех определяется как стабильный состав, удовлетворяющий техническим требованиям, установленным для выбранной критической характеристики качества (CQA) эффективности. Тестирование эквивалентности проводили среди образцов в T0 и после стресса: для сравнения эквивалентности критерии приемлемости определяли по максимальной утрате эффективности (МЕ/мл), которую можно допустить: в данном эксперименте допустимую утрату эффективности определяли как предел Δ эффективности $\geq -0,30 \log \text{МЕ/мл}$.

Полученные экспериментальные данные показаны в табл. 6 и применялись для уменьшения экспериментальной области и расчета проектного поля на основании эффективности.

Данные включают 45 наблюдений. Имеются 12 различных буферов, которые тестировали в трех повторностях, и один дополнительный, который получали три раза в отдельности, и каждый отдельный препарат тестировали в трех повторностях (центральные точки).

Таблица 6. Экспериментальные значения для каждого состава, выраженные в виде Δ эффективности (log ME/мл)

Групповое название	Δ эффективности (log_ME на мл)	Примечания
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	ЦЕНТРАЛЬНАЯ ТОЧКА
F-00.1	-0,27	ЦЕНТРАЛЬНАЯ ТОЧКА
F-00.1	-0,26	ЦЕНТРАЛЬНАЯ ТОЧКА
F-03	-0,3	
F-03	-0,33	
F-03	-0,24	
F-00.2	-0,2	ЦЕНТРАЛЬНАЯ ТОЧКА
F-00.2	-0,28	ЦЕНТРАЛЬНАЯ ТОЧКА
F-00.2	-0,22	ЦЕНТРАЛЬНАЯ ТОЧКА
F-04	-0,18	
F-04	-0,26	
F-04	-0,24	
F-00.3	-0,21	ЦЕНТРАЛЬНАЯ ТОЧКА

F-00.3	-0,18	ЦЕНТРАЛЬНАЯ ТОЧКА
F-00.3	-0,16	ЦЕНТРАЛЬНАЯ ТОЧКА
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	

К данным была подобрана следующая модель:

```

delta_log_potency[i] ~ normal(mu[i], sigma);
for(i in 1:Nobs){
  mu[i] <- alpha_0 +
    alpha_pH * pH[i] +
    alpha_Citrate * Citrate[i] +
    alpha_HBCD * HBCD[i] +
    alpha_EtOH * EtOH[i] +
    alpha_PS_80 * PS_80[i] +
    alpha_NaCl * NaCl[i] +
    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]];

```

где alpha-r-batch представляет произвольную партию, а sigma - остаточную ошибку.

Для получения предсказаний из модели для формирования риск-ориентированного подхода проектного поля применяли байесовскую сеть, поскольку можно легко получить прогнозируемое совместное распределение CQA с учетом параметров состава (см. Peterson и соавторы и Lebrun и соавторы).

Риск-ориентированное проектное поле определяется с помощью следующего вероятностного утверждения:

$$\text{Проектное поле} = \{\tilde{x} \in \chi \mid P(\text{CQA} \in \Lambda \mid X = \tilde{x}, \text{данные}) \geq \pi\} \quad (1)$$

Другими словами, проектное поле представляет собой участок экспериментальной области χ (часто называемой пространством знаний), где апостериорная вероятность того, что CQA удовлетворяют техническим требованиям (Λ), выше, чем установленный уровень качества π , с учетом данных из наблюдений. Данное представление делает неявным включение неопределенности, включаемой в статистическую модель. Вероятность является непосредственной мерой совместного удовлетворения гарантий качества техническим требованиям. Для вычисления этой вероятности статистические модели можно записать в виде следующего стандартного линейного уравнения. Для j -й CQA в модель вносили поправку:

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

где y_i представляет собой любое преобразование, применяемое к i -й CQA в целях получения хороших статистических свойств (например, тождественные, логарифмические или логит-преобразования),

$i=1, \dots, 7$. Параметры модели b_i и σ_i^2 подлежат оценке (см. вышеприведенные статьи).

Апостериорную вероятность из уравнения (1) рассчитывают на основании прогнозируемого распределения новых откликов, определяемого как следующее распределение Стьюдента (индексы i удалены для простоты):

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

Это трехпараметрическое распределение Стьюдента имеет $n-p$ степеней свободы (для n наблюдений и p параметров модели), имеет центром среднюю линию регрессии $\tilde{x}\hat{\beta}$, рассчитывается на основании оценки по обычному методу наименьших квадратов

$$S = a \cdot (1 + \tilde{x}'(X'X)^{-1}\tilde{x}),$$

где параметр a представляет собой остаточную сумму квадратов, т.е. $a = (y - X\hat{\beta})'(y - X\hat{\beta})$.

Таким образом, S означает масштаб распределения Стьюдента. Оценку дисперсии рассчитывают как $S/(n-p)$.

Для исследования экспериментальной области не рекомендуется создавать координатную сетку по 5 факторам (по причине проблемы размерности: в случае оценки 2 уровней на фактор это привело бы к получению координатной сетки 25 размера; в случае 10 уровней на фактор это привело бы к получению координатной сетки 105 размера и т.п.). Вместо этого получали ряд произвольных образцов и исследовали их следующим образом:

а) выбрать большое количество произвольных (равномерно распределенных по χ) условий эксплуатации (устанавливаемых параметров факторов) \hat{x}_i в экспериментальной области;

б) для каждого условия эксплуатации выполнить большое количество операций имитационного моделирования:

выбрать n^* образцов $\tilde{y}_{ij} \mid \hat{x}_j$, данные ($i = 1, \dots, n^*$) из прогнозируемых распределений согласно уравнению (3) для каждой CQA;

с) на основании различных операций имитационного моделирования предсказания CQA рассчитать долю образцов, удовлетворяющих техническим требованиям.

Данная доля является оценкой апостериорной вероятности получения выходных параметров качества с учетом критических характеристик качества и их технических требований. В заключение предлагается визуально оценить произвольное распределение эксплуатационных значений на парных графиках проекции результатов на двумерные пространства для определения проектного поля (фиг. 11).

Расчеты затем адаптировали и диапазоны значений факторов уменьшали для максимального повышения вероятности успеха в отношении CQA эффективности в этих диапазонах (табл. 7), которые отражают так называемые нормальные диапазоны эксплуатации (NOR) и проектное поле. Диапазоны, показанные в табл. 7, обеспечивают наибольшую вероятность успеха получения стабильного состава. Эти диапазоны, таким образом, обеспечивают оптимальную стабильность продукта.

Таблица 7. Проектное поле с выбранными диапазонами значений факторов (NOR)

Фактор состава	Технические требования
pH	5,9-6,2
Цитрат (мМ)	10-25
НВCD (вес/вес)	4-6
EtOH (вес/вес)	0,3-0,45
PS-80 (вес/вес)	0,018-0,035
NaCl (мМ)	70-100

Литературные источники.

Altaras N E et al. "Production and formulation of adenovirus vectors", *Advances in biochemical engineering*, Springer, Berlin, DE, vol. 99, 1 November 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 February 2010.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

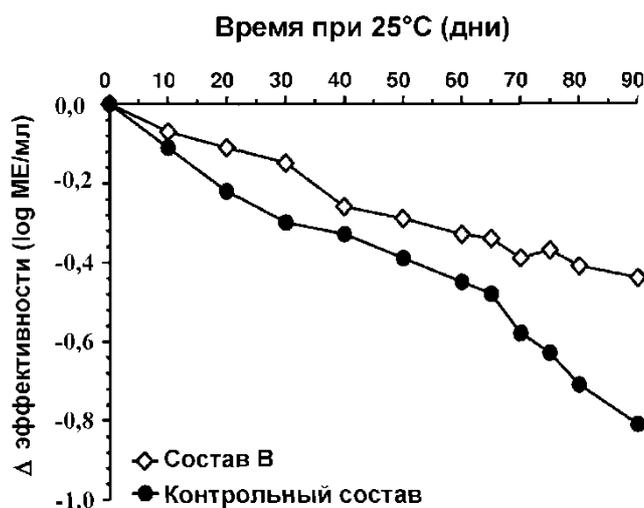
1. Композиция для стабилизации количества, эффективности, инфекционности и качества аденовирусов, содержащая:

- a) аденовирусы;
 - b) цитратный буфер в концентрации от 5 до 30 мМ;
 - c) гидроксипропил-β-циклодекстрин (НВCD) в концентрации от 1 до 10% (вес./вес.);
 - d) хлорид натрия в концентрации от 20 до 200 мМ;
 - e) полисорбат-80 в концентрации от 0,005 до 0,5% (вес./вес.);
- где указанная композиция имеет pH в диапазоне от 5,5 до 6,5.

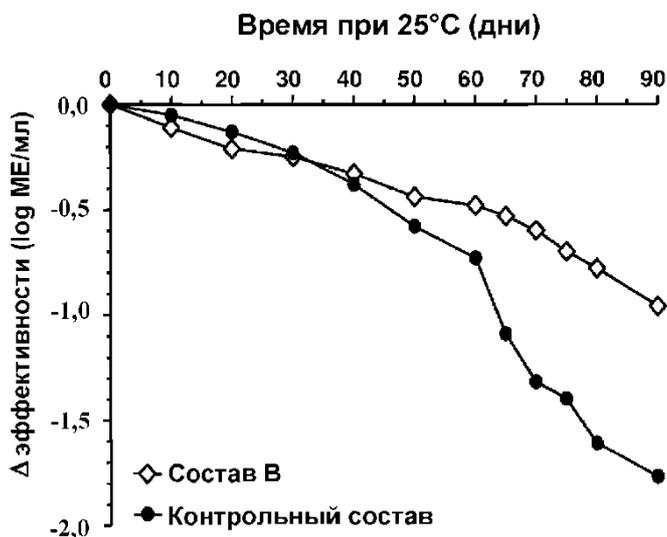
2. Композиция по п.1, которая имеет pH в диапазоне от 5,7 до 6,3.

3. Композиция по любому из пп.1 или 2, которая дополнительно содержит спирт с 2 или 4 атомами углерода.

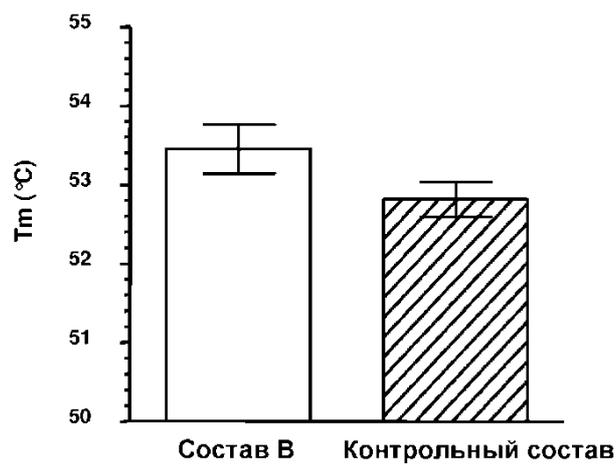
4. Композиция по п.3, в которой указанный спирт представляет собой этанол.
5. Композиция по п.4, в которой этанол находится в концентрации от 0,1 до 1% (вес./вес.).
6. Композиция по любому из пп.3-5, которая имеет рН в диапазоне от 5,7 до 6,3 и содержит полисорбат-80 в концентрации от 0,01 до 0,05% (вес./вес.); этанол в концентрации от 0,2 до 0,6% (вес./вес.).
7. Композиция по п.6, которая имеет рН 6 и содержит цитрат в концентрации 20 мМ; НВСД в концентрации 5% (вес./вес.); NaCl в концентрации 80 мМ; полисорбат-80 в концентрации 0,025% (вес./вес.) и этанол в концентрации 0,4% (вес./вес.).
8. Композиция по любому из пп.4-6, которая имеет рН в диапазоне от 5,9 до 6,2 и содержит цитрат в концентрации от 10 до 25 мМ; НВСД в концентрации от 4 до 6% (вес./вес.); NaCl в концентрации от 70 до 100 мМ; полисорбат-80 в концентрации от 0,018 до 0,035% (вес./вес.); этанол в концентрации от 0,3 до 0,45% (вес./вес.).
9. Композиция по любому из пп.1-8, которая представляет собой жидкую композицию.
10. Композиция по любому из пп.1-9, которая подходит для парентерального применения.



Фиг. 1



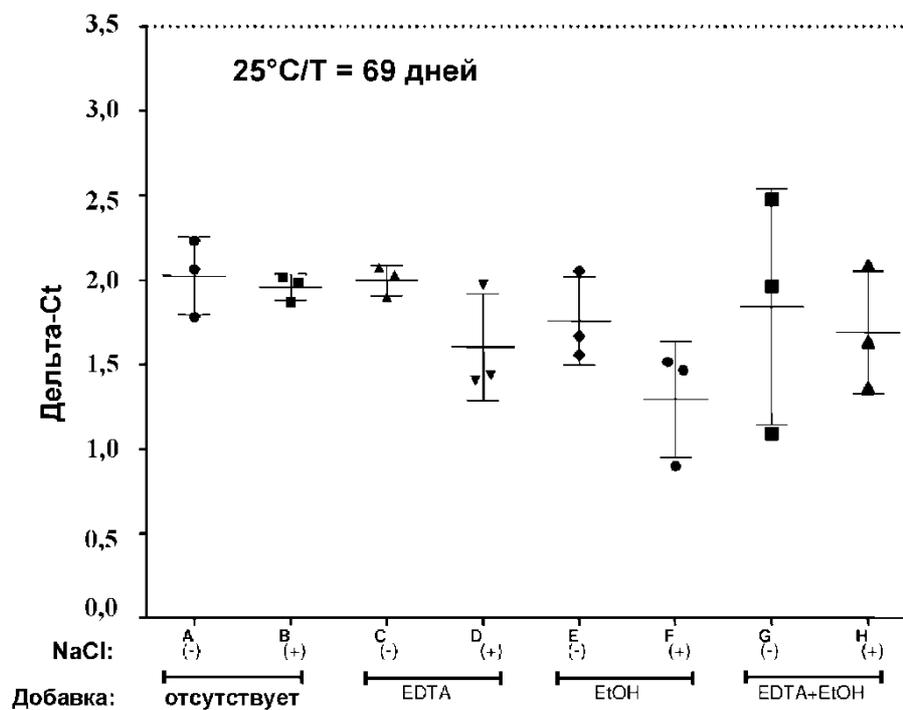
Фиг. 2



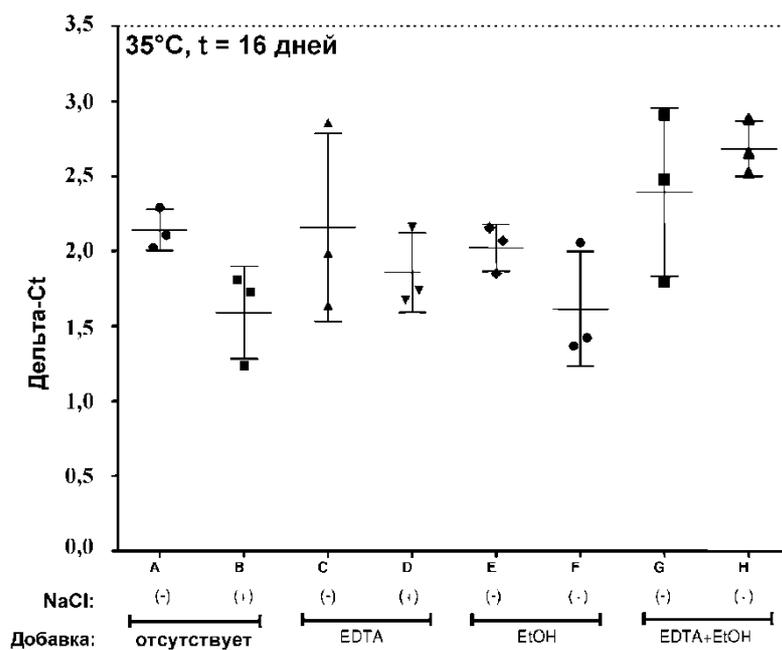
Фиг. 3



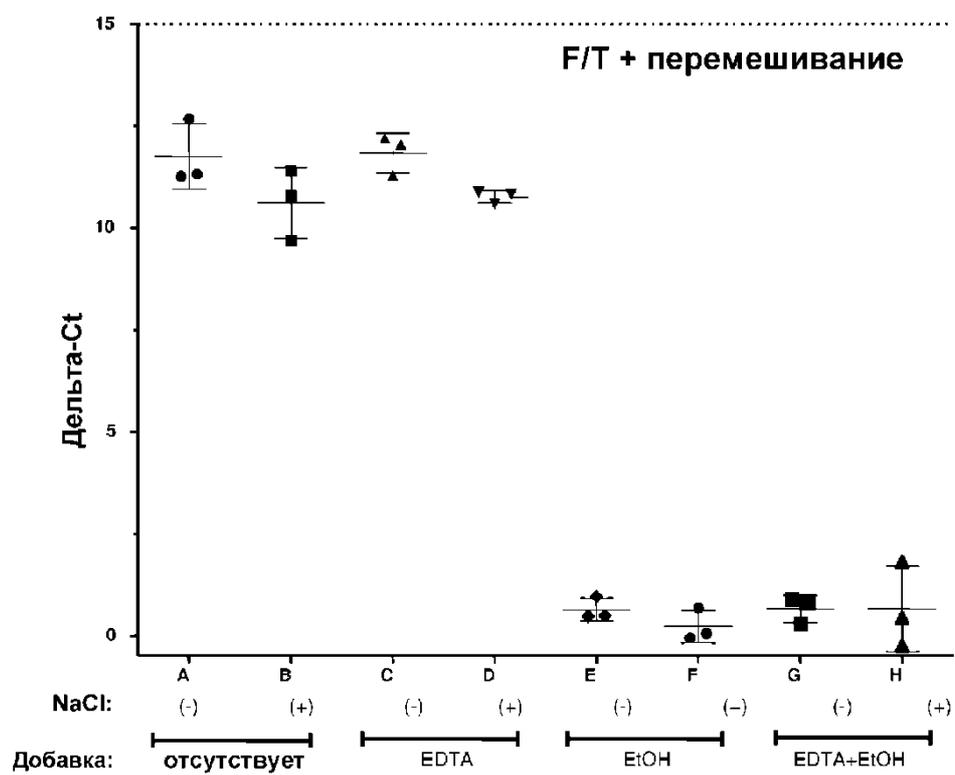
Фиг. 4



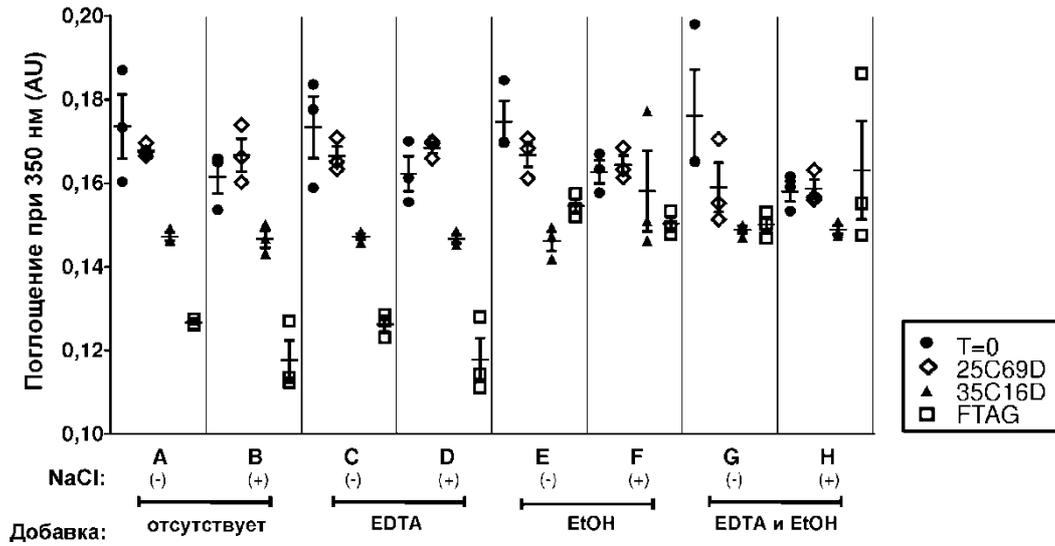
Фиг. 5



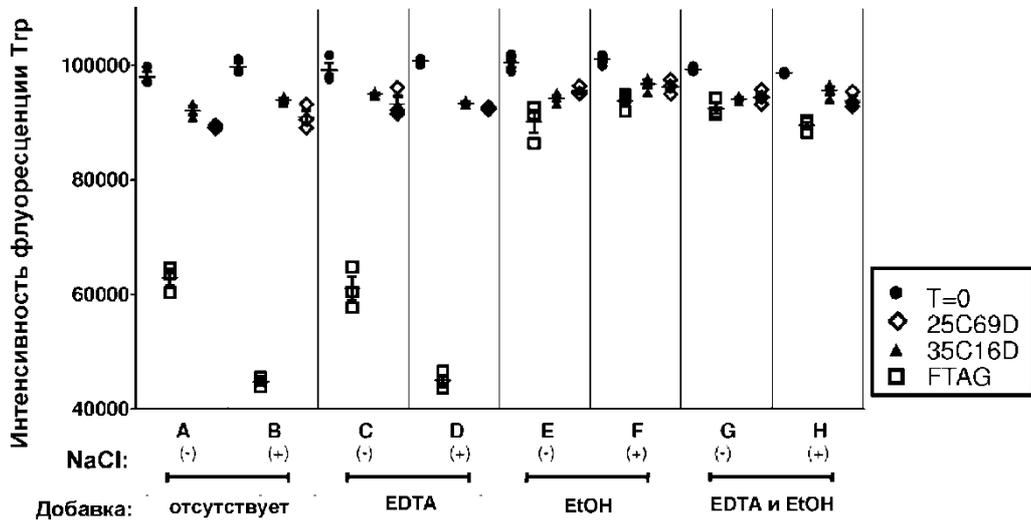
Фиг. 6



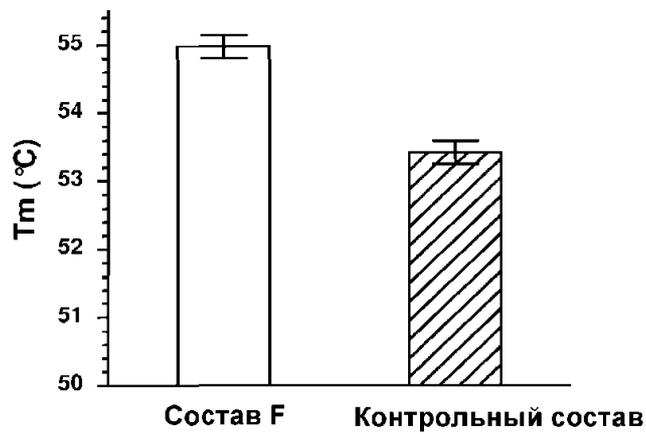
Фиг. 7



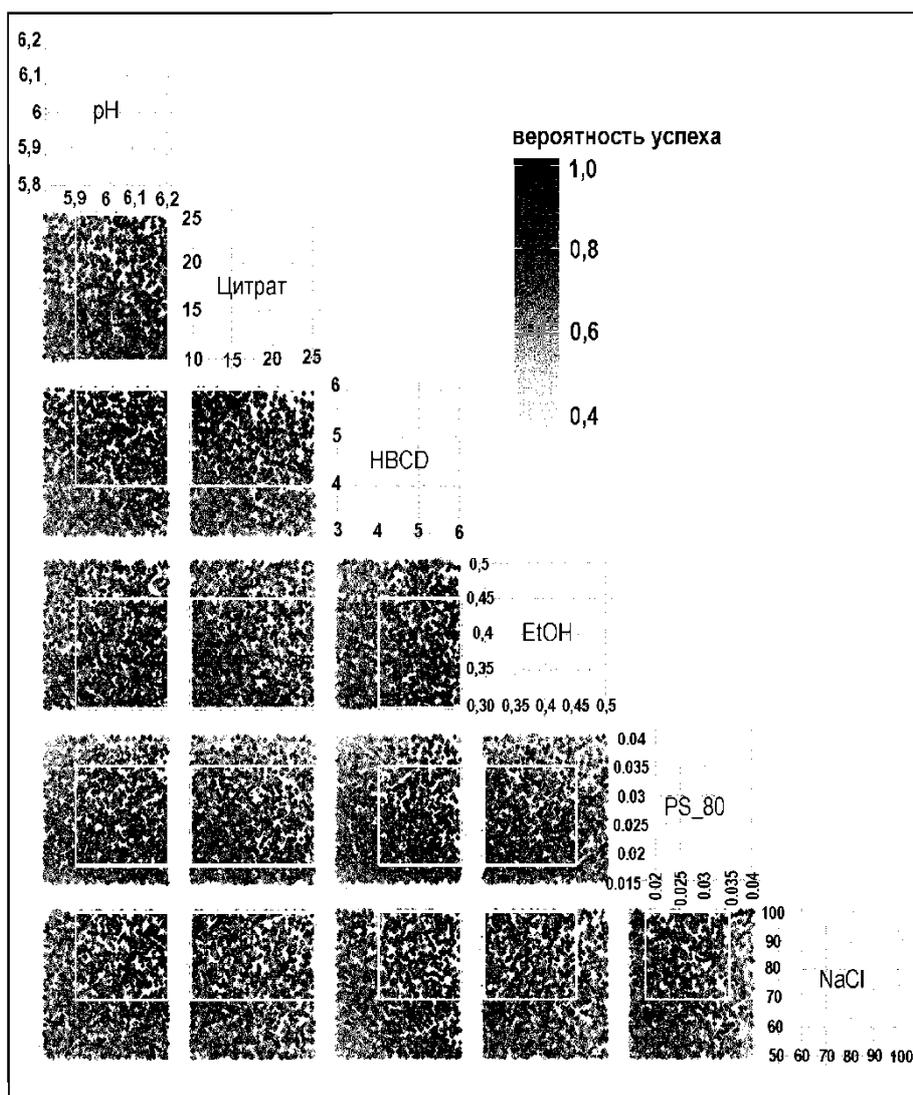
Фиг. 8



Фиг. 9



Фиг. 10



Фиг. 11



Евразийская патентная организация, ЕАПВ

Россия, 109012, Москва, Малый Черкасский пер., 2