

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202091318 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2020.11.13

(51) Int. Cl. *A61K 47/10* (2017.01)
A61K 9/08 (2006.01)
A61K 35/761 (2015.01)

(22) Дата подачи заявки
2019.01.31

(54) ПРЕПАРАТ, СОДЕРЖАЩИЙ АДЕНОВИРУС ГРУППЫ В

(31) 1801614.7

(72) Изобретатель:

(32) 2018.01.31

Элвис Саймон, Кельтыка Магдалена
(GB)

(33) GB

(86) PCT/EP2019/052398

(74) Представитель:

(87) WO 2019/149829 2019.08.08

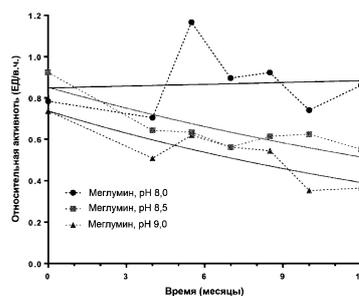
Нилова М.И. (RU)

(71) Заявитель:

ПСАЙОКСУС ТЕРАПЬЮТИКС
ЛИМИТЕД (GB)

(57) В настоящем изобретении предложен жидкий препарат, подходящий для аденовируса группы В, содержащий а) аденовирус группы В, такой как репликационно компетентный аденовирус группы В; б) от 15 до 25% об./об. глицерина, например 16, 17, 18, 19, 20, 21% об./об. глицерина; с) от 0,1 до 1,5% об./об. этанола, например 0,2-1% об./об., например 1% об./об. этанола; d) буфер и e) необязательно, аминокислоту, где рН указанного препарата составляет от 8,0 до 9,6, и применение указанного препарата в лечении, в частности в лечении рака.

Анализ относительной онколитической активности (буферный агент, 20% глицерина, 1,4% этанола, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина), хранение при 4 °С



A1

202091318

202091318

A1

ПРЕПАРАТ, СОДЕРЖАЩИЙ АДЕНОВИРУС ГРУППЫ В

Настоящее изобретение относится к препарату аденовируса группы В, такого как энаденотуцирев (EnAd), к способу получения указанного препарата и применению указанного препарата в лечении, в частности, лечении рака.

Область техники

В настоящее время фармацевтическая отрасль находится на пороге осознания потенциала вирусов в качестве терапевтических средств для применения у людей. На сегодняшний день вирус, полученный из ONXY-15 (ONYX Pharmaceuticals, приобретен Shanghai Sunway Biotech), одобрен для применения при раке головы и шеи в ограниченном числе стран, а Imlygic® был одобрен в лечении меланомы. Тем не менее, в настоящее время ряд вирусов проходит клинические испытания, что, как все надеются, приведет к регистрации некоторых из них для применения у людей.

Ряд методов вирусной терапии основан на аденовирусах, таких как аденовирусы группы В, например, EnAd. EnAd (ранее известный как ColoAd1) – это химерный онколитический аденовирус (WO2005/118825), который в настоящее время проходит клинические испытания в лечении эпителиального рака. Эти терапевтические агенты на основе аденовирусов должны производиться в количествах, подходящих для поддержания как клинических испытаний, так и спроса после регистрации, и в условиях, которые соответствуют надлежащей производственной практике (GMP).

Препараты аденовирусов для долгосрочного хранения известны в данной области техники, см., например, патенты US7,888,096 и US7,351,415. Такие препараты применялись для суспендирования аденовирусов группы С, таких как Ad5, в частности, дефектных по репликации вирусов Ad5, сконструированных для экспрессии человеческого р53.

Свойства аденовирусов группы В отличаются от аденовирусов группы С, например, вирусы группы В инфицируют клетки через CD46, тогда как вирусы группы С инфицируют клетки через рецептор CAR (рецептор вируса Коксаки и аденовируса). Время удерживания вирусов группы В в анализе методом высокоэффективной жидкостной хроматографии отличается от времени удерживания вирусов группы С. См., например, фиг. 7, где показано относительное время удерживания вирусов типа Ad5 и Ad11 (такого как EnAd).

Авторы настоящего изобретения обнаружили, что когда известные из уровня техники препараты применяются для суспендирования аденовирусов группы В, таких как EnAd, аденовирусы могут храниться только при 4 °С в течение очень короткого времени, после чего происходит значительное ухудшение как концентрации вируса, так и его активности. Этот тип ухудшения (разложения) называется химическим разложением, поскольку он является следствием химических процессов, протекающих в препарате.

Физическая стабильность также очень важна, например, физическая нестабильность может выражаться в агрегации, что может привести к повышению иммуногенности.

Соответственно, существует потребность в улучшенном препарате, специально разработанном для более долгосрочного хранения аденовирусов группы В, например, препаратах, подходящих для хранения при 4 °С. Это позволяет препаратам храниться в

течение более длительных периодов времени при 4 °С, с минимальным отрицательным влиянием на активность и жизнеспособность аденовирусов. Это, в свою очередь, значительно упрощает и удешевляет хранение и транспортировку препаратов, например, от предприятия-изготовителя до клиники.

5 Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что, хотя ряд ингредиентов важен для стабилизации препарата вируса группы В, небольшое количество этанола, по-видимому, необходимо для минимизации разложения и поддержания инфекционности.

10 В настоящем раскрытии предложена комбинация ингредиентов, которые вместе стабилизируют вирусы группы В, такие как EnAd, в частности, при 4 °С.

Краткое описание изобретения

15 Настоящее изобретение относится к препаратам, подходящим для хранения аденовирусов группы В, например, вируса группы В, кодирующего по меньшей мере один трансген, и кратко изложено в следующих абзацах:

1. Жидкий препарат, подходящий для аденовируса группы В, содержащий:
 - a) аденовирус группы В, такой как репликационно компетентный аденовирус группы В,
 - b) от 15 до 25 % об./об. глицерина (например, от 17 до 20 % об./об.), например, 16, 17, 18, 19, 20, 21 % об./об. глицерина; и
 - c) от 0,1 до 1,6 % об./об. этанола, например, 0,1-1,5 % об./об., например, 1 % об./об. этанола или, в качестве альтернативы, 1,4 % об./об. или 1,5 % об./об.;
 - d) буфер,
 где рН препарата составляет от 8,0 до 9,6, например, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4 или 9,5, например, от 8,5 до 9,5, в частности, от 8,5 до 9,0, более конкретно, рН составляет 8,5, 8,6, 8,7, 8,8 или 8,9.
2. Препарат согласно абзацу 1, где рН составляет 8,0.
3. Препарат согласно абзацу 1, где рН составляет 8,1.
4. Препарат согласно абзацу 1, где рН составляет 8,2.
5. Препарат согласно абзацу 1, где рН составляет 8,3.
6. Препарат согласно абзацу 1, где рН составляет 8,4.
7. Препарат согласно абзацу 1, где рН составляет 8,5.
8. Препарат согласно абзацу 1, где рН составляет 8,6.
9. Препарат согласно абзацу 1, где рН составляет 8,7.
10. Препарат согласно абзацу 1, где рН составляет 8,8.
11. Препарат согласно абзацу 1, где рН составляет 8,9.
12. Препарат согласно абзацу 1, где рН составляет 9.
13. Препарат согласно любому из абзацев 1-12, предназначенный для введения путем внутривенного введения, например, после разбавления жидкостью для инъекций, такой как изотонический раствор или вода для инъекций.
14. Препарат согласно абзацу 13, предназначенный для введения путем медленной инъекции.

15. Препарат согласно абзацу 13, предназначенный для введения путем инфузии.
16. Препарат согласно любому из абзацев 1-15, дополнительно содержащий поверхностно-активное вещество, например, неионогенное поверхностно-активное вещество.
17. Препарат согласно абзацу 16, дополнительно содержащий полисорбат, например, полисорбат 20, 40, 60 или 80, например, 0,05-0,15 % об./об. полисорбата 20, 40, 60 или 80.
18. Препарат согласно абзацу 17, содержащий полисорбат 80, например, 0,05-0,15 % об./об. полисорбата 80, например, 0,115 % об./об. полисорбата 80.
19. Препарат согласно любому из абзацев 1-18, дополнительно содержащий метионин, например, 0,01-0,3 мМ, например, 0,01-0,25, в частности, 0,25 мМ метионина.
20. Препарат согласно любому из абзацев 1-18, дополнительно содержащий метионин, например, 0,01-0,3 мМ, например, 0,01-0,2, например, 0,15 мМ метионина.
21. Препарат согласно любому из абзацев 1-20, дополнительно содержащий от 5 до 20 мМ, например, 15 мМ аргинина.
22. Препарат согласно любому из абзацев 1-20, дополнительно содержащий аргинин, например, от 5 до 15 мМ, например, 10 мМ аргинина.
23. Препарат согласно любому из абзацев 1-20, где буфер выбран из меглумина, Gly-NaCl и TRIS.
24. Препарат согласно абзацу 23, содержащий меглуминовый буфер.
25. Препарат согласно любому из абзацев 1-24, не содержащий буфер HEPES.
26. Препарат согласно любому из абзацев 1-15, содержащий:
 - a) 15-20 % об./об. глицерина;
 - b) 1-1,5 % об./об. этанола;
 - c) 0,2-0,3 мМ метионина;
 - d) 10-20 мМ аргинина; и
 - e) буфер, такой как меглумин; и
 - f) необязательно, 0,1-0,2 % об./об. полисорбата 80;где рН препарата составляет от 8,0 до 9,5, например, от 8,0 до 9,0, например, рН составляет 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или 9,0, в частности, 8,0.
27. Препарат согласно абзацу 26, содержащий
 - a) 20 % об./об. глицерина;
 - b) 1,4-1,5 % об./об. этанола;
 - c) 0,25 мМ метионина;
 - d) 15 мМ аргинина; и
 - e) буфер, такой как меглумин;где рН препарата составляет от 8,0 до 9,5, например, от 8,0 до 9,0, например, рН составляет 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или 9,0, в частности, 8,0.
28. Препарат согласно любому из абзацев 1-15, содержащий:
 - a) 20 % об./об. глицерина;
 - b) 1 % об./об. этанола;
 - c) 0,115 % об./об. полисорбата 80;
 - d) 0,15 мМ метионина;

- e) 10 мМ аргинина; и
- f) буфер, такой как меглумин;

где рН препарата составляет от 8,0 до 9,5, например, от 8,5 до 9,5, например, рН составляет 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9 или 9,0, в частности, 9,0.

29. Препарат согласно любому из абзацев 1-28, где аденовирус группы В содержит последовательность формулы (I):



где:

V_1 представляет собой связь или содержит E1A, E1B или E1A-E1B;

V_A содержит -E2B-L1-L2-L3-E2A-L4;

V_2 представляет собой связь или содержит E3;

V_X представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансенов или и то, и другое;

V_B содержит L5;

V_Y представляет собой связь или последовательность ДНК, содержащую сайт рестрикции, один или более трансенов или и то, и другое;

V_3 представляет собой связь или содержит E4;

где по меньшей мере один из V_X или V_Y не является связью.

30. Препарат согласно абзацу 29, где V_X содержит трансген или трансгенную кассету.
31. Препарат согласно абзацу 29 или абзацу 30, где V_Y содержит трансген или трансгенную кассету.
32. Препарат согласно абзацу 29, где V_Y содержит трансген или трансгенную кассету, а V_X представляет собой связь.
33. Препарат согласно любому из абзацев 29-32, где один или более трансенов или трансгенных кассет находятся под контролем эндогенного или экзогенного промотора, например, эндогенного промотора.
34. Препарат согласно абзацу 33, где трансген или трансгенная кассета находится под контролем эндогенного промотора, выбранного из группы, состоящей из промотора E4 и главного позднего промотора, в частности, главного позднего промотора.
35. Препарат согласно любому из абзацев 29-34, где трансгенная кассета дополнительно содержит регуляторный элемент, независимо выбранный из:
- a) последовательности акцептора сплайсинга (например, короткой последовательности акцептора сплайсинга CAGG, SEQ ID NO: 1 или SEQ ID NO: 2),
 - b) последовательности участка внутренней посадки рибосомы или пептида 2A с высокой эффективностью саморасщепления,
 - c) последовательности Козак и
 - d) их комбинаций.
36. Препарат согласно абзацу 35, где трансгенная кассета содержит последовательность Козак, находящуюся в начале последовательности, кодирующей белок.

37. Препарат согласно любому из абзацев 29-36, где трансгенная кассета кодирует пептид 2А с высокой эффективностью саморасщепления, например, пептид Р2А, пептид Е2А, пептид F2А и пептид Т2А.
38. Препарат согласно абзацу 37, где трансгенная кассета кодирует множество пептидов 2А с высокой эффективностью саморасщепления, например, 2, 3 или 4 пептида.
39. Препарат согласно абзацу 38, где саморасщепляющиеся пептиды кодируются неидентичными последовательностями ДНК.
40. Препарат согласно любому из абзацев 29-39, где трансгенная кассета дополнительно содержит последовательность полиаденилирования.
41. Препарат согласно любому из абзацев 29-40, где трансгенная кассета дополнительно содержит последовательность, кодирующую лидерную последовательность.
42. Препарат согласно любому из абзацев 29-41, где трансгенная кассета дополнительно содержит сайт рестрикции на 3'-конце последовательности ДНК и/или на 5'-конце последовательности ДНК.
43. Препарат согласно любому из абзацев 29-42, где по меньшей мере одна трансгенная кассета кодирует моноцистронную мРНК.
44. Препарат согласно любому из абзацев 29-43, где по меньшей мере одна трансгенная кассета кодирует полицистронную мРНК.
45. Препарат согласно любому из абзацев 29-44, где трансген кодирует последовательность РНКи, полипептид (такой как белок или пептид).
46. Препарат согласно абзацу 45, где полипептид представляет собой антитело или его связывающий фрагмент.
47. Препарат согласно абзацу 46, где антитело или его связывающий фрагмент являются специфичными к OX40, лиганду OX40, CD27, CD28, CD30, CD40, лиганду CD40, CD70, CD137, GITR, 4-1BB, ICOS, лиганду ICOS, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, VISTA, B7-H3, B7-H4, HVEM, ILT-2, ILT-3, ILT-4, TIM-3, LAG-3, BTLA, LIGHT, CD160, CTLA-4, PD-1, PD-L1, PD-L2, например, к CD40 и лиганду CD40.
48. Препарат согласно любому из абзацев 45-47, где кодируемый полипептид представляет собой цитокин, независимо выбранный из группы, содержащей IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, IL-18, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-33, IL-35, IL-2, IL-4, IL-5, IL-7, IL-10, IL-15, IL-21, IL-25, IL-1RA, IFN α , IFN β , IFN γ , TNF α , TGF β , лимфотоксин- α (LTA) и GM-CSF, например, IL-12, IL-18, IL-22, IL-7, IL-15, IL-21, IFN γ , TNF α , TGF β и лимфотоксин- α (LTA).
49. Препарат согласно любому из абзацев 24-44, где кодируемый полипептид независимо выбран из группы, содержащей IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CCR7, CCR8, CXCR3, CXCR4, CXCR5 и CRTN2, например, CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21, CXCR2, CCR2, CCR4 и CXCR4 или их рецептор (например, хемокин, выбранный из IL-8, CCL5, CCL17, CCL20, CCL22, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL13, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21 или их рецептора, более конкретно, CCL5, CXCL9, CXCL12, CCL2, CCL19, CCL21 или их рецептора).
50. Препарат согласно любому из абзацев 29-49, где кодируемый полипептид представляет собой репортерный ген, например, натрий-йодидный симпортер, внутриклеточные

металлопротеины, HSV1-tk, GFP, люциферазу или эстрогеновый рецептор, например, натрий-йодидный симпортер.

51. Препарат согласно абзацу 50, где репортерный ген представляет собой флуоресцентный белок.
52. Препарат согласно любому из абзацев 1-51, где область E4orf4 аденовируса является нефункциональной, например, полностью подвергнутой делеции, частично подвергнутой делеции или усеченной.
53. Препарат согласно любому из абзацев 1-48, где область E2B аденовируса является химерной, например, где область E2B содержит последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из первого серотипа аденовируса, и последовательность нуклеиновой кислоты, полученную из второго, отличающегося серотипа аденовируса; где каждый из указанных первого и второго серотипов выбран из подгрупп аденовирусов В, С, D, Е или F.
54. Препарат согласно любому из абзацев 1-53, где аденовирус является химерным EnAd.
55. Препарат согласно любому из абзацев 1-54, где аденовирус представляет собой Ad11.
56. Препарат согласно любому из абзацев 1-55, где аденовирус группы В является репликационно компетентным.
57. Препарат согласно любому из абзацев 1-56, где вирус представлен в SEQ ID NO: 14 или ее производном, например, без His-метки.
58. Препарат согласно любому из абзацев 1-57, где вирус представлен в SEQ ID NO: 15 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
59. Препарат согласно любому из абзацев 1-58, где вирус представлен в SEQ ID NO: 16 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
60. Препарат согласно любому из абзацев 1-59, где вирус представлен в SEQ ID NO: 17 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
61. Препарат согласно любому из абзацев 1-60, где вирус представлен в SEQ ID NO: 18 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
62. Препарат согласно любому из абзацев 1-61, где вирус представлен в SEQ ID NO: 19 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
63. Препарат согласно любому из абзацев 1-62, где вирус представлен в SEQ ID NO: 20 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
64. Препарат согласно любому из абзацев 1-63, где вирус представлен в SEQ ID NO: 21 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
65. Препарат согласно любому из абзацев 1-64, где вирус представлен в SEQ ID NO: 22 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
66. Препарат согласно любому из абзацев 1-65, где вирус представлен в SEQ ID NO: 23 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
67. Препарат согласно любому из абзацев 1-66, где вирус представлен в SEQ ID NO: 24 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
68. Препарат согласно любому из абзацев 1-67, где вирус представлен в SEQ ID NO: 25 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.

90. Препарат согласно любому из абзацев 1-89, где вирус представлен в SEQ ID NO: 47 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
91. Препарат согласно любому из абзацев 1-86, где вирус представлен в SEQ ID NO: 48 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
92. Препарат согласно любому из абзацев 1-91, где вирус представлен в SEQ ID NO: 49 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
93. Препарат согласно любому из абзацев 1-92, где вирус представлен в SEQ ID NO: 50 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
94. Препарат согласно любому из абзацев 1-93, где вирус представлен в SEQ ID NO: 51 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
95. Препарат согласно любому из абзацев 1-94, где вирус представлен в SEQ ID NO: 52 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
96. Препарат согласно любому из абзацев 1-95, где вирус представлен в SEQ ID NO: 53 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
97. Препарат согласно любому из абзацев 1-96, где вирус представлен в SEQ ID NO: 54 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
98. Препарат согласно любому из абзацев 1-97, где вирус представлен в SEQ ID NO: 55 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
99. Препарат согласно любому из абзацев 1-98, где вирус представлен в SEQ ID NO: 56 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
100. Препарат согласно любому из абзацев 1-99, где вирус представлен в SEQ ID NO: 57 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
101. Препарат согласно любому из абзацев 1-100, где вирус представлен в SEQ ID NO: 58 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
102. Препарат согласно любому из абзацев 1-101, где вирус представлен в SEQ ID NO: 59 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
103. Препарат согласно любому из абзацев 1-102, где вирус представлен в SEQ ID NO: 60 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
104. Препарат согласно любому из абзацев 1-103, где вирус представлен в SEQ ID NO: 61 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
105. Препарат согласно любому из абзацев 1-104, где вирус представлен в SEQ ID NO: 62 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
106. Препарат согласно любому из абзацев 1-105, где вирус представлен в SEQ ID NO: 63 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
107. Препарат согласно любому из абзацев 1-106, где вирус представлен в SEQ ID NO: 64 или ее производном, например, без His-метки.
108. Препарат согласно любому из абзацев 1-107, где вирус представлен в SEQ ID NO: 65 или ее производном, например, с His-меткой или без нее.
109. Препарат согласно любому из абзацев 1-108 для применения в лечении.
110. Препарат согласно абзацу 109 для применения в лечении рака, например, колоректального рака, гепатомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной

железы, рака молочной железы, рака яичника, рака щитовидной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи или рака легкого.

111. Препарат согласно абзацу 109 или абзацу 110 для внутривенного введения, например, после разбавления жидкостью для инъекций.
112. Препарат согласно абзацу 109 или абзацу 110 для внутриопухолевого введения.
113. Применение препарата согласно любому из абзацев 1-107 для производства лекарственного средства в лечении рака, например, колоректального рака, гепатомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичника, рака щитовидной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи или рака легкого.
114. Способ лечения, включающий введение препарата согласно любому из абзацев 1-108 нуждающемуся в этом пациенту.
115. Способ лечения согласно абзацу 114, где пациент, подлежащий лечению, страдает от рака, например, колоректального рака, гепатомы, рака предстательной железы, рака поджелудочной железы, рака молочной железы, рака яичника, рака щитовидной железы, рака почки, рака мочевого пузыря, рака головы и шеи или рака легкого.
116. Способ согласно абзацу 114 или абзацу 115, где препарат вводят путем внутривенной или внутриопухолевого введения.

Авторы настоящего изобретения установили, что препарат, описанный в настоящем документе, обладает тем преимуществом, что позволяет успешно хранить аденовирусы группы В, такие как EnAd, например, при 4 °С, в течение длительного времени, например, 6 месяцев или более, например, 1 года, 1,5 лет и 2 лет (в частности, 18-24 месяцев, например, 5 18, 19, 20, 21, 22, 23 или 24 месяцев), без значительного разложения или снижения активности. Агрегация также может быть сведена к минимуму в препаратах согласно настоящему изобретению. Препараты согласно изобретению также могут быть стабильными при таких температурах, как 25 °С, в течение периодов времени средней продолжительности.

10 Долгосрочное хранение вируса может, например, осуществляться при таких температурах, как -60 °С или ниже, более конкретно, в диапазоне от -60 до -80 °С, в частности, при -60, -61, -62, -63, -64, -65, -66, -67, -68, -69, -70, -71, -72, -73, -74, -75, -76, -77, -78, -79 и -80.

В одном из вариантов осуществления препараты согласно настоящему изобретению имеют рН от 8,5 до 9,5 (например, рН 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4 или 9,5), что значительно выше физиологического рН, т. е. рН 7,4.

15 В одном из вариантов осуществления препарат имеет рН 9,0. Неожиданно авторы настоящего изобретения обнаружили, что высокий рН оказывает значительное влияние на стабильность аденовирусов группы В (таких как EnAd) в препарате.

Концентрация глицерина также важна для стабильности аденовирусов группы В (таких как EnAd).

20 По данным Агентства по лекарственным средствам ЕС, хотя этанол применяется в пероральных и местных фармацевтических препаратах, содержащих химические вещества небольшого размера, и гомеопатических средствах, применение этанола сопряжено с определенными опасениями по поводу безопасности. Этанол является депрессантом центральной нервной системы. Интоксикация от легкой до умеренной степени у взрослых

может включать эйфорию, атаксию, седативный эффект, агрессивное поведение, тошноту и рвоту. В более высоких дозах он может вызвать угнетение или остановку дыхания, а также кардиотоксичность, такую как предсердная тахикардия, фибрилляция предсердий, аритмии, атриовентрикулярная блокада, гипотензия, застойная сердечная недостаточность и тяжелое нарушение миокардиальной функции. У детей интоксикация этанолом может привести к гипогликемии, гипотермии и коме. Другие токсические эффекты после острого воздействия включают судороги, гипотонию, гипорефлексию, желудочно-кишечные кровотечения, острый гепатит, острый панкреатит, рабдомиолиз, гипокалиемию и лактоацидоз.

Метаболизм этанола варьирует у разных людей и с возрастом, например, некоторые люди испытывают дефицит фермента алкогольдегидрогеназы, что снижает их способность метаболизировать алкоголь. В препаратах для внутривенного введения этанол попадает прямо в кровоток, что максимизирует любые токсические эффекты. Кроме того, вводимые объемы могут быть большими, так, от 500 мл до 1 л препарата, содержащего 10% этанола, составляет от 50 до 100 мл этанола.

Таким образом, хотя этанол, по-видимому, важен для стабилизации препаратов аденовируса группы В, важно, чтобы токсичность этанола в препарате была сведена к минимуму. Удивительно, что очень небольшие количества этанола, например, менее 1,5%, например, менее 1%, достаточны для обеспечения стабилизации. В одном из вариантов осуществления применяется не более 1,5% этанола, например, не более 1%. Это обеспечивает преимущества, поскольку сводит к минимуму токсичность этанола, одновременно обеспечивая стабилизирующий эффект. Кроме того, это делает препараты подходящими для применения у большинства категорий пациентов.

В одном из вариантов осуществления препарат согласно настоящему изобретению содержит неионогенное поверхностно-активное вещество, например, выбранное из группы, содержащей цетомакрогол 1000 (также известный как Brij 52, 56 или 58), цетостеариловый спирт, пальмитиновую кислоту, глицеринмонолаурат, олеиловый спирт, полксамеры, плуроник F127, полисорбаты (например, полисорбат 20, 40, 60, 80 или 85), стеариновую кислоту, сорбитантристеарат. В одном из вариантов осуществления применяют неионогенное поверхностно-активное вещество с гидрофильно-липофильным балансом в диапазоне от 14,5 до 17.

В одном из вариантов осуществления препарат дополнительно содержит полисорбат, например, полисорбат 20, 40, 60 или 80, например, 0,05-0,15% полисорбата 20, 40, 60, 80 или комбинацию двух или более из них. В одном из вариантов осуществления препарат содержит 0,05%, 0,06%, 0,07%, 0,08%, 0,09%, 0,10%, 0,11%, 0,12%, 0,13%, 0,14% или 0,15% полисорбата 20, 40, 60 80 или комбинацию двух или более из них. Преимущество добавления полисорбата в препарат заключается в том, что полисорбат помогает сохранить активность аденовируса группы В при долгосрочном хранении и может минимизировать агрегацию.

В одном из вариантов осуществления препарат содержит полисорбат 80, например, 0,05-0,15% полисорбата 80, например, 0,09-0,11% полисорбата 80, например, 0,1% или 0,115% полисорбата. В одном из вариантов осуществления препарат содержит 0,115% полисорбата.

Неионогенное поверхностно-активное вещество, в частности, полисорбат (такой как полисорбат 80), обеспечивает преимущество, состоящее в том, что оно уменьшает или

подавляет напряжение на поверхности раздела в препарате, например, уменьшает поверхностное напряжение, оказываемое на вирус, которое, в свою очередь, может вызвать разрушение вируса.

5 Не ограничиваясь какой-либо конкретной теорией, полагают, что добавление определенных аминокислот, например, метионина, аргинина и их комбинаций, в препарат может снизить взаимодействие вирус/вирус и, таким образом, способствовать стабилизации распределения аденовируса группы В в препарате, например, путем обеспечения стерической защиты. Добавление аминокислоты (аминокислот), например, метионина, аргинина и их комбинаций, также может оптимизировать избирательную гидратацию/эксклюзию аденовируса группы В. Полагают, что этот параметр имеет большое значение для стабилизации аденовируса группы В. Избирательные взаимодействия могут быть выражены с точки зрения избирательного связывания соразтворителя (такого как вода) или его избирательной эксклюзии (избирательная гидратация).

10 В одном из вариантов осуществления препарат дополнительно содержит по меньшей мере одну аминокислоту, например, 1, 2 или 3 аминокислоты.

15 В одном из вариантов осуществления по меньшей мере одна аминокислота имеет гидрофобную боковую цепь, например, выбрана из аланина, изолейцина, лейцина, метионина, валина и их комбинаций.

20 В одном из вариантов осуществления препарат дополнительно содержит метионин, например, 0,01-0,3 мМ (0,01-0,2 мМ), например, 0,01, 0,02, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06, 0,07, 0,08, 0,09, 0,10, 0,12, 0,13, 0,14, 0,15, 0,16, 0,17, 0,18, 0,19, 0,20 мМ, например, 0,15 мМ метионина. В качестве альтернативы, метионин может содержаться в препарате в концентрации 0,25 мМ.

25 В одном из вариантов осуществления препарата по меньшей мере одна аминокислота имеет основную заряженную боковую цепь, например, выбрана из аргинина, гистидина, лизина и их комбинаций.

30 В одном из вариантов осуществления препарат дополнительно содержит аргинин, например, от 1 до 20 мМ (или от 1 до 15 мМ), например, от 2 до 10 мМ аргинина, например, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5 или 10 мМ аргинина. В одном из вариантов осуществления аргинин содержится в препарате в количестве от 10 до 20 мМ, например, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 или 20 мМ, например, 14, 15 или 16 мМ. Добавление аргинина в препарат обеспечивает преимущество, состоящее в том, что он дополнительно повышает стабильность аденовирусов, особенно в течение первых 12 месяцев хранения.

35 В одном из вариантов осуществления препарат дополнительно содержит одно или более из следующего: меглуминовый буфер, глициновый буфер, трис-буфер. Было показано, что все эти буферы обеспечивают хорошую стабильность при включении в раскрытый препарат.

В одном из вариантов осуществления препарат содержит меглуминовый буфер, например, при pH 8,0. Меглуминовый буфер подходит для применения в диапазоне pH от 8,0 до 10,5, например, от 8,5 до 10,5.

40 В одном из вариантов осуществления буфер представляет собой TRIS. TRIS способен поддерживать pH в диапазоне от 7 до 9. В одном из вариантов осуществления буфер не содержит TRIS.

В одном из вариантов осуществления буфер представляет собой глициновый буфер, способный поддерживать рН в диапазоне от 8,6 до 10,6.

Буфер должен быть выбран в соответствии с рН, например, HEPES способен поддерживать рН только до рН 8,2. Другие буферы, раскрытые в настоящем документе, могут обеспечивать улучшенные профили стабильности для аденовирусов группы В по сравнению с HEPES. Таким образом, хотя HEPES обычно применяют для хранения аденовирусов группы В, таких как EnAd, в одном из вариантов осуществления препарат не содержит буфер HEPES.

В одном из вариантов осуществления вирус в препарате согласно настоящему изобретению кодирует 1, 2, 3 или 4 трансгена.

10

Определения для формулы (I)

В одном из вариантов осуществления V_x содержит сайт рестрикции, например, 1, 2, 3 или 4 сайта рестрикции, например, 1 или 2. В одном из вариантов осуществления V_x содержит по меньшей мере один трансген, например, 1 или 2 трансгена. В одном из вариантов осуществления V_x содержит по меньшей мере один трансген, например, 1 или 2 трансгена, и один или более сайтов рестрикции, например, 2 или 3 сайта рестрикции, в частности, где между сайтами рестрикции размещен ген или последовательность ДНК, содержащая гены, что обеспечивает возможность его/их специфичного вырезания из генома и/или замены. В качестве альтернативы, между сайтами рестрикции может быть размещен каждый ген, например, в случае двух трансгенов необходимо три разных сайта рестрикции, чтобы обеспечить селективное вырезание и/или замену указанных генов. В одном из вариантов осуществления один или более, например, все трансгенов находятся в форме трансгенной кассеты.

В одном из вариантов осуществления V_x не содержит сайт рестрикции. В одном из вариантов осуществления V_x представляет собой связь. В одном из вариантов осуществления V_x содержит или состоит из одного или более трансгенов.

В одном из вариантов осуществления V_y содержит сайт рестрикции, например, 1, 2, 3 или 4 сайта рестрикции, например, 1 или 2. В одном из вариантов осуществления V_y содержит по меньшей мере один трансген, например, 1 или 2 трансгена. В одном из вариантов осуществления V_y содержит по меньшей мере один трансген, например, 1 или 2 трансгена, и один или более сайтов рестрикции, например, 2 или 3 сайта рестрикции, в частности, где между сайтами рестрикции размещен ген или последовательность ДНК, содержащая гены, что обеспечивает возможность его/их специфичного вырезания из генома и/или замены. В качестве альтернативы, между сайтами рестрикции может быть размещен каждый ген, например, в случае двух трансгенов необходимо три разных сайта рестрикции, чтобы обеспечить селективное вырезание и/или замену указанных генов.

В одном из вариантов осуществления V_y не содержит сайт рестрикции. В одном из вариантов осуществления V_y представляет собой связь. В одном из вариантов осуществления V_y содержит или состоит из одного или более трансгенов.

Помимо минимизации размера трансгенной кассеты, применение эндогенного промотора в вирусе также может обеспечить преимущество в терапевтическом контексте, поскольку трансген экспрессируется только тогда, когда вирус реплицируется. Это

40

отличается от конститутивного экзогенного промотора, который будет непрерывно транскрибировать трансен и может привести к неправильной концентрации или локализации кодируемой структуры, такой как кодируемый полипептид.

5 В качестве альтернативы, применение экзогенного промотора может обеспечить преимущества, поскольку он может интенсивно и конститутивно экспрессировать кодируемую структуру, что может быть удобно в некоторых ситуациях, например, когда пациент страдает от очень распространенного рака. Следовательно, в одном из вариантов осуществления экспрессия трансгена находится под контролем промотора CMV.

10 В одном из вариантов осуществления трансенная кассета дополнительно содержит регуляторный элемент, независимо выбранный из последовательности акцептора сплайсинга, последовательности участка внутренней посадки рибосомы или пептида 2A с высокой эффективностью саморасщепления, последовательности Козак и их комбинаций.

В одном из вариантов осуществления трансенная кассета содержит последовательность Козак, находящуюся в начале последовательности, кодирующей белок.

15 В одном из вариантов осуществления трансенная кассета кодирует пептид 2A с высокой эффективностью саморасщепления.

В одном из вариантов осуществления трансенная кассета дополнительно содержит последовательность полиаденилирования.

20 В одном из вариантов осуществления трансенная кассета дополнительно содержит сайт рестрикции на 3'-конце последовательности ДНК и/или на 5'-конце последовательности ДНК.

Подробное описание изобретения

25 Раскрытый в настоящем документе препарат имеет щелочной pH, составляющий выше физиологического pH. Поддержание определенного значения pH отдельно взятого раствора может быть осуществлено с применением обычных методик, известных в данной области техники, например, включая кислотную/щелочную систему, включая Tris, лизин, сильную кислоту (например, HCl) или слабую кислоту (например, уксусную кислоту или малеиновую кислоту, сильное основание (например, NaOH) или слабое основание (например, аммиак).

30 В контексте настоящего документа термин «буфер» относится к буферу, подходящему для суспендирования или хранения аденовирусов группы В, например, без негативного влияния на структурную целостность указанных аденовирусов группы В или их способность к репликации. Большинство используемых в настоящее время биологических буферов были разработаны NE Good и его научно-исследовательской группой (Good et al. 1966, Good & Izawa 1972, Ferguson et al. 1980; "Good buffers") и включают N-замещенные тауриновые или глициновые буферы. Некоторые обычно используемые биологические буферы перечислены ниже. Этот список не является исчерпывающим, и специалистам также известны и другие буферы.

40 В одном из вариантов осуществления раскрытый препарат содержит один или более из следующих буферов: буфер 2-аминоэтансульфоновой кислоты (AES), формиатный буфер (такой как буфер формиата аммония, буфер ацетата аммония), буфер 2-амино-2-метил-1-

пропанола (AMP), буфер 2-амино-2-метил-1-пропандиола (AMPD), буфер *N*-(1,1-диметил-2-гидроксиэтил)-3-амино-2-гидроксипропансульфоновой кислоты (AMPSO), бициновый буфер, бис-трис-пропан, буфер борной кислоты, буфер 3-(циклогексиламино)-2-гидрокси-1-пропансульфоновой кислоты (CAPSO), буфер *N*-циклогексил-2-аминоэтансульфоновой кислоты (CHES), буфер 3-[4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинил] пропансульфоновой кислоты (HEPPS), 1-метилпиперидиновый буфер, буфер 4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-(2-гидроксипропансульфоновой кислоты) (HEPPSO), глицилглициновый буфер, буфер дигидрата пиперазин-1,4-бис(2-гидроксипропансульфоновой кислоты) или пиперазин-*N,N'*-бис(2-гидроксипропансульфоновой кислоты) (POPSO), буфер [трис(гидроксиметил) метиламино]пропансульфоновой кислоты (TAPS), буфер 3-[*N*-трис(гидроксиметил)метиламино]-2-гидроксипропансульфоновой кислоты (TAPSO), триэтаноламиновый буфер, буфер 2-[трис(гидроксиметил)метиламино]этансульфоновой кислоты (TES), трициновый буфер, меглуминовый буфер, глициновый буфер (такой как Gly-NaOH), буфер TRIS.

В одном из вариантов осуществления раскрытый препарат содержит один или более из следующих буферов: меглуминовый буфер, буфер Gly-NaCl, буфер TRIS.

«Долгосрочный» в контексте настоящего документа относится к по меньшей мере 6 месяцам, например, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35 или 36 месяцам. В одном из вариантов осуществления раскрытый препарат позволяет стабильно хранить аденовирусы группы В в течение по меньшей мере 12 месяцев, например, 12 месяцев, 18 месяцев и 24 месяцев. Если не указано иное, долгосрочное хранение обычно относится к хранению при 4 °С.

В одном из вариантов осуществления препарат хранят при температуре в диапазоне от -1 до -95°C, например, от -1 до -80°C, например, при -1, -2, -3, -4 или -65, -66, -67, -68, -69, -70, -71, -72, -73, -74, -75, -77, -78, -79, -80, -81, -82, -83, -84, -85, -86, -87, -88, -89 или -90°C, в частности, при -80°C.

В одном из вариантов осуществления предложен жидкий парентеральный препарат (включая восстановленный препарат), например, для инфузии или инъекции, например, со способным к репликации онколитическим вирусом согласно настоящему изобретению, где указанный препарат обеспечивает дозу от 1×10^{10} до 1×10^{14} вирусных частиц на объем дозы.

В одном из вариантов осуществления жидкие препараты предоставляются в виде концентрата, который требует разбавления перед введением пациенту.

В одном из вариантов осуществления препарат предоставляется в виде лиофилизированного препарата для восстановления инъекционной жидкостью, такой как вода для инъекций, физиологический раствор или глюкоза.

В одном из вариантов осуществления препарат предоставляется в виде жидкого концентрата для разбавления жидкостью для инъекций, такой как вода для инъекций, физиологический раствор, глюкоза или тому подобное.

В одном из вариантов осуществления препарат производят в виде жидкости (не подвергаемой лиофилизации), в частности, в конечной форме, то есть пригодной для введения пациенту.

Парентеральный препарат означает препарат, разработанный для доставки не через ЖКТ. Типичные способы парентеральной доставки включают инъекцию, имплантацию или инфузию. В одном из вариантов осуществления указанный препарат предложен в форме для болюсной доставки.

5 В одном из вариантов осуществления указанный парентеральный препарат находится в форме инъекции. Инъекция включает внутривенную, подкожную, внутриопухолевую или внутримышечную инъекцию. «Инъекция» в контексте настоящего документа означает введение жидкости в организм через шприц. В одном из вариантов осуществления способ согласно настоящему изобретению не включает внутриопухолевую
10 инъекцию.

В одном из вариантов осуществления парентеральный препарат находится в форме инфузии.

Инфузия в контексте настоящего документа означает введение жидкостей путем капельного введения, инфузионного насоса, шприцевого насоса или эквивалентного
15 устройства. В одном из вариантов осуществления инфузию осуществляют в течение периода времени от 1,5 минут до 120 минут, например, приблизительно 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 65, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110 или 115 минут.

В одном из вариантов осуществления объем одной дозы препарата составляет менее
20 100 мл, например, 30 мл, например, объем, вводимый с помощью шприцевого насоса.

В одном из вариантов осуществления инъекцию проводят медленно, например, в течение периода времени от 1,5 до 30 минут. Медленная инъекция в контексте настоящего документа представляет собой выполняемую вручную инъекцию с помощью шприца.

В одном из вариантов осуществления препарат предназначен для внутривенного
25 (в/в) введения. Указанный способ особенно эффективен для доставки онколитического вируса, поскольку позволяет обеспечить быстрый доступ к большинству органов и тканей, и особенно подходит в лечении метастазов, например, тяжелых метастазов, в особенности локализованных в высокоvascularизованных областях, таких как печень и легкие.

Терапевтические препараты, как правило, стерильны и стабильны в условиях
30 производства и хранения. Композиция может быть приготовлена в виде раствора, микроэмульсии, липосомы или другого парентерального препарата, подходящего для введения человеку.

Препараты согласно настоящему изобретению могут быть приготовлены в виде
35 предварительно заполненного устройства, такого как шприц или флакон, в частности, в виде разовой дозы.

Препарат обычно содержит фармацевтически приемлемый разбавитель или носитель, например, нетоксичный изотонический носитель, совместимый с вирусом, в котором вирус стабилен на протяжении требуемого периода времени.

Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду,
40 содержащую, например, воду, этанол, многоатомный спирт (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль, и т. п.), и подходящие смеси перечисленного. Надлежащую текучесть можно поддерживать, например, путем применения

диспергирующего агента или поверхностно-активного вещества, например, лецитина или неионогенного поверхностно-активного вещества, например, полисорбата 80 или 40. В дисперсиях поддержанию требуемого размера частиц может способствовать наличие поверхностно-активного вещества. Примеры изотонических агентов включают сахара, многоатомные спирты, такие как маннит, сорбит, или хлорид натрия в композиции.

В одном из вариантов осуществления используемые парентеральные препараты могут включать сахар, например, декстрозу, маннозу, сахарозу или подобное, соль, такую как хлорид натрия, хлорид магния или хлорид калия, и комбинацию двух или более из них.

В одном из вариантов осуществления препарат согласно настоящему изобретению не содержит сахар. Компоненты буфера не считаются сахарами для целей настоящего изобретения.

В одном из вариантов осуществления препарат согласно настоящему изобретению не содержит соль, такую как хлорид натрия. Реагенты, используемые в буфере, не считаются солью для целей настоящего изобретения.

В одном из вариантов осуществления препарат согласно настоящему изобретению не содержит двухвалентный катион, например, CaCl_2 и/или MgCl_2 .

Препарат также может содержать консервант, такой как ЭДТА. В одном из вариантов осуществления препарат согласно настоящему изобретению не содержит ЭДТА.

В одном из вариантов осуществления препарат согласно настоящему изобретению не содержит хлорбутанол.

В одном из вариантов осуществления препарат согласно настоящему изобретению не содержит желатин.

В одном из вариантов осуществления препараты не содержат каких-либо ингредиентов, повышающих иммуногенность аденовируса группы В, т. е. препараты не содержат адъюванта(ов).

В одном из вариантов осуществления препарат содержит очищенный онколитический вирус согласно настоящему изобретению, например, от 1×10^{10} до 1×10^{14} вирусных частиц на дозу, например, от 1×10^{10} до 1×10^{12} вирусных частиц на дозу. В одном из вариантов осуществления концентрация вируса в препарате составляет от 2×10^8 до 2×10^{14} в.ч./мл, например, 2×10^{12} в.ч./мл.

Подробное обсуждение фармацевтически приемлемых носителей приведено в Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Company, N.J. 1991).

Настоящее изобретение также охватывает жидкие растворы или суспензии, доставляемые интраназально, например, с применением устройства, раскрытого в заявках WO2009/068877 и US2004/0153033, обе из которых включены в настоящий документ посредством ссылки.

Используемый аденовирус группы В обычно относится к аденовирусу, способному к репликации (включая репликационно компетентный), или к дефектному по репликации вирусу, обозначенному как вирус группы В, например, Ad11, такой как Ad11p, включая его химеры, такие как EnAd, если из контекста не следует иное. В некоторых случаях этот термин может использоваться для обозначения только репликационно компетентных вирусов, что будет ясно из контекста.

Подгруппа В (группа В или тип В) в контексте настоящего документа относится к вирусам с по меньшей мере фибриллой и гексоном из аденовируса группы В, например, с целым капсидом из вируса группы В, например, по существу целым геномом из вируса группы В. Вирусы подгруппы В включают 3, 7, 11, 14, 16, 21, 34, 35, 50 и 55.

5 В одном из вариантов осуществления вирус согласно изобретению, такой как онколитический вирус, имеет гексон Ad11, такой как гексон A11p. В одном из вариантов осуществления вирус согласно изобретению, такой как онколитический вирус, имеет фибриллу подгруппы В. Один из вирусов согласно изобретению, таких как онколитический вирус, имеет фибриллу Ad11, такую как фибрилла A11p. В одном из вариантов осуществления вирус согласно изобретению, такой как онколитический вирус, имеет белки фибриллы и гексона одного и того же серотипа, например, аденовируса подгруппы В, такого как Ad11, в частности, Ad11p.

В одном из вариантов осуществления вирус согласно изобретению, такой как онколитический вирус, содержит белки фибриллы, гексона и пентона от одного и того же серотипа, например, Ad11, в частности, Ad11p, например, находящиеся в положениях 30811-31788, 18254-21100 и 13682-15367 геномной последовательности последнего.

Энаденотуцирев (EnAd) представляет собой химерный онколитический аденовирус, ранее известный как ColoAd1 (WO2005/118825), с фибриллой, пентоном и гексоном из Ad11p, следовательно, это вирус подгруппы В. Он имеет химерную область E2В, содержащую ДНК из Ad11p и Ad3. Почти вся область E3 и часть области E4 в EnAd подвергнуты делеции.

E3 в контексте настоящего документа относится к последовательности ДНК, кодирующей часть области или всю область E3 аденовируса (т.е. белок/полипептид), она может быть мутирована таким образом, что белок, кодируемый геном E3, содержит консервативные или неконсервативные аминокислотные замены, таким образом, что он обладает такой же функцией, что и белок дикого типа (соответствующий немутированный белок); повышенной функцией по сравнению с белком дикого типа; сниженной функцией, например, отсутствием функции, по сравнению с белком дикого типа, или обладает новой функцией по сравнению с белком дикого типа; или характеризуется комбинацией перечисленного, в зависимости от конкретного случая. Если часть области E3 подвергнута делеции (частично подвергнута делеции в области E3), это включает в себя делецию от 1 до 99% области E3, например, делецию 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97 или 98%, например, в кодирующей и/или некодирующей области гена.

E4 в контексте настоящего документа относится к последовательности ДНК, кодирующей область E4 аденовируса (т. е. область белка/полипептида), которая может быть мутирована таким образом, что белок, кодируемый геном E4, содержит консервативные или неконсервативные аминокислотные замены и обладает такой же функцией, что и белок дикого типа (соответствующий немутированный белок); повышенной функцией по сравнению с белком дикого типа; сниженной функцией, например, отсутствием функции, по сравнению с белком дикого типа, или обладает новой функцией по сравнению с белком дикого типа; или характеризуется комбинацией перечисленного, в зависимости от конкретного случая.

Область E4 может иметь определенную функцию или функции, относящиеся к репликации вируса, и, таким образом, модификации, такие как делеция области E4, могут влиять на жизненный цикл и репликацию вируса, например, так, что для репликации может потребоваться упаковывающая клетка.

5 В одном из вариантов осуществления в E4 область E4ORF4 подвергнута делеции.

В контексте настоящего документа термин «полученный из» относится, например, к случаю, где фрагмент ДНК взят из аденовируса или соответствует последовательности, изначально содержащейся в аденовирусе. Это выражение не предназначено для ограничения способа получения последовательности, например, последовательность, 10 используемая в вирусе согласно настоящему изобретению, может быть синтезирована.

В одном из вариантов осуществления производное обладает 100% идентичностью по всей длине последовательности исходной последовательности ДНК.

В одном из вариантов осуществления производное обладает 95, 96, 97, 98 или 99% идентичностью или сходством с исходной последовательностью ДНК.

15 В одном из вариантов осуществления производное гибридизуется в жестких условиях с исходной последовательностью ДНК.

В контексте настоящего документа термин «жесткость» обычно относится к диапазону от приблизительно T_m (температура плавления)-50 °C (на 5° ниже T_m зонда) до температуры, приблизительно на 20-25 °C ниже T_m . Как ясно специалистам в данной области 20 техники, жесткие условия гибридизации применяются для идентификации или обнаружения идентичных полинуклеотидных последовательностей или для идентификации или обнаружения схожих или родственных полинуклеотидных последовательностей. В контексте настоящего документа термин «жесткие условия» означает, что гибридизация обычно происходит, если между последовательностями существует по меньшей мере 95%, 25 например, по меньшей мере 97% идентичность.

В контексте настоящего документа термин «гибридизация» включает «любой процесс, посредством которого полинуклеотидная цепь соединяется с комплементарной цепью посредством спаривания оснований» (Coombs, J., *Dictionary of Biotechnology*, Stockton Press, New York, N.Y., 1994).

30 Онколитические вирусы представляют собой вирусы, избирательно инфицирующие раковые клетки и ускоряющие гибель клеток, например, путем их лизиса, или избирательно реплицируются в раковых клетках. Вирусы, избирательно инфицирующие раковые клетки, представляют собой вирусы, демонстрирующие более высокую степень инфицирования раковых клеток по сравнению с нормальными здоровыми клетками.

35 Вирусы, избирательно реплицирующиеся в раковых клетках, представляют собой вирусы, которым для репликации требуется ген или белок, повышенный в раковой клетке, такой как ген p53.

40 Область E2B является известной областью в группе аденовирусов группы В и составляет около 18% вирусного генома. Полагают, что она кодирует белок IVa2, ДНК-полимеразу и терминальный белок. В штамме Ad11 Slobitski (называемом Ad11p) эти белки кодируются в положениях 5588-3964, 8435-5067 и 10342-8438, соответственно, в геномной последовательности, и область E2B находится в пределах 10342-3950. Точное положение

области E2B может изменяться в других серотипах, но функция сохраняется во всех геномах аденовируса человека, исследованных до настоящего времени, поскольку они имеют одинаковое общее устройство.

5 Способность к репликации в контексте настоящего документа относится к вирусу, способному реплицироваться *in vivo*, включая вирус с репликацией, зависящей от активации гена в пораженной клетке, такого как p53, и репликационно компетентные вирусы.

В одном из вариантов осуществления вирус является репликационно компетентным. Под репликационно компетентным вирусом в контексте настоящего документа понимается вирус, способный к репликации без помощи комплементарной клеточной линии, кодирующей необходимый вирусный белок, такой как белок, кодируемый областью E1 (также называемой упаковочной клеточной линией), и вирус, способный к репликации без помощи вируса-помощника.

Вирусные векторы, используемые в настоящем документе, являются дефектными по репликации. Дефектные по репликации вирусы согласно настоящему изобретению требуют упаковывающей клеточной линии для репликации. Упаковывающие клеточные линии содержат ген или гены, дополняющие гены, которых лишен вирус.

В одном из вариантов осуществления настоящее изобретение относится к способу приготовления фармацевтического препарата, включающему стадию смешивания аденовируса группы В (такого как репликационно компетентный вирус группы В) с от 15 до 20 25 % об./об. глицерина, от 0,1 до 1,5 % об./об. этанола, буфером (где % об./об. представляет собой конечный объем препарата) и, если необходимо, доведения рН до значения от 8,0 до 9,5, например, от 8,0 до 9,5 (или от 8,5 до 9,5), например, от 8,0 до 8,5 (или от 8,5 до 9).

В одном из вариантов осуществления способ дополнительно включает добавление от 0,01 до 0,3 мМ, например, от 0,01 до 0,25 мМ (или от 0,01 до 2 мМ), например, 0,25 мМ (или 0,15 25 мМ) метионина.

В одном из вариантов осуществления препарат содержит последовательность вируса, раскрытую в прилагаемом перечне последовательностей, поданном с настоящей заявкой.

Лечение

30 Пациентом-реципиентом препарата согласно настоящему изобретению может быть человек или животное, такое как домашнее животное. В одном из вариантов осуществления пациент представляет собой человека, такого как взрослый человек.

Препарат согласно настоящему изобретению подходит для препарата способных к репликации (включая репликационно компетентные) аденовирусов группы В и дефектных по репликации аденовирусных векторов группы В, для терапевтических и диагностических применений, например, для применений для генной терапии, вакцин, лечения рака и тому подобного.

В дополнительном аспекте настоящее изобретение охватывает препарат, как описано в настоящем документе, для применения в лечении, в частности, в лечении рака.

40 В одном из вариантов осуществления способ лечения предназначен для применения в лечении опухоли.

«Опухоль» в контексте настоящего документа относится к патологическому образованию в ткани, возникающему в результате избыточного деления клеток, которое является неконтролируемым и прогрессирующим, и также называется новообразованием. Опухоли могут быть доброкачественными (нераковыми) или злокачественными. «Опухоль» охватывает все формы рака и метастазов. В одном из вариантов осуществления опухоль является раковой.

В одном из вариантов осуществления опухоль представляет собой солидную опухоль. Сплошная опухоль может быть локализованной или метастазировавшей.

В одном из вариантов осуществления опухоль имеет эпителиальное происхождение.

В одном из вариантов осуществления опухоль представляет собой злокачественное новообразование, такое как колоректальный рак, гепатома, рак предстательной железы, рак поджелудочной железы, рак молочной железы, рак яичника, рак щитовидной железы, рак почки, рак мочевого пузыря, рак головы и шеи или рак легкого.

В одном из вариантов осуществления опухоль представляет собой колоректальное злокачественное новообразование.

«Злокачественное новообразование» в контексте настоящего документа относится к раковым клеткам.

В одном из вариантов осуществления онколитический аденовирус используют в лечении или предупреждения метастазов.

В одном из вариантов осуществления препарат в настоящем документе используют в лечении фармакорезистентного рака.

В одном из вариантов осуществления вирус вводят в комбинации с проведением дополнительного лечения или терапии рака.

В одном из вариантов осуществления предложен препарат согласно настоящему изобретению для применения для изготовления лекарственного средства в лечении рака, например, рака, описанного выше.

В дополнительном аспекте предложен способ лечения рака, включающий введение терапевтически эффективного количества препарата согласно настоящему изобретению нуждающемуся в этом пациенту, например, человеку.

В одном из вариантов осуществления препарат в настоящем документе вводят в комбинации с проведением другой терапии.

«В комбинации» в контексте настоящего документа понимается как охватывающее введение препарата, описанного в настоящем документе, до, одновременно и/или после проведения лечения или терапии рака. Однако, как правило, схемы лечения для комбинированной терапии обычно перекрываются.

Терапия рака включает хирургическое вмешательство, лучевую терапию, таргетную терапию и/или химиотерапию.

Лечение рака в контексте настоящего документа также относится к лечению с помощью терапевтического соединения или биологического агента, например, антитела, предназначенного в лечении рака и/или поддерживающей терапии при раке.

В одном из вариантов осуществления лечение рака выбрано из любой другой противораковой терапии, включая химиотерапевтический агент; противораковый агент

направленного действия, такой как конъюгат антитело-лекарственное средство; радиационную терапию, радиоизотопную терапию или любую комбинацию перечисленного.

В одном из вариантов осуществления препарат согласно настоящему изобретению может применяться в качестве предварительного лечения перед проведением терапии, такой как хирургическое вмешательство (неoadъювантная терапия), для уменьшения опухоли, в лечении метастазирования и/или предотвращения метастазирования или дальнейшего метастазирования. Препарат может применяться после терапии, такой как хирургическое вмешательство (адъювантная терапия), в лечении метастазирования и/или предотвращения метастазирования или дальнейшего метастазирования.

В одном из вариантов осуществления препарат согласно настоящему изобретению применяют в поддерживающей терапии.

В одном из вариантов осуществления препарат согласно настоящему изобретению вводят в комбинации с, например, одновременно с, терапией рака.

«Одновременно» в контексте настоящего документа относится к проведению дополнительного лечения рака в то же самое время или приблизительно в то же время, что и введение препарата. Указанное лечение может содержаться в том же препарате или быть введено в виде отдельного препарата.

В одном из вариантов осуществления вирус вводят в комбинации с, например, одновременно с, введением химиотерапевтического агента.

Химиотерапевтический агент в контексте настоящего документа относится к специфическим антинеопластическим химическим агентам или лекарственным средствам, которые селективно действуют разрушительным образом на злокачественные клетки и ткани. Например, они включают алкилирующие агенты, антиметаболиты, антрациклины, растительные алкалоиды, ингибиторы топоизомеразы и другие противоопухолевые агенты. Примеры специфических химиотерапевтических агентов включают доксорубицин, 5-фторурацил (5-FU), паклитаксел, капецитабин, иринотекан и препараты платины, такие как цисплатин и оксалиплатин. Доза может быть выбрана лечащим врачом в зависимости от природы рака, лечение которого проводят.

Комбинированная терапия и химиотерапевтические агенты

Препарат согласно настоящему изобретению может применяться в комбинации с дополнительной терапией рака, например, химиотерапией.

В настоящем документе термины «химиотерапевтический агент» и «химиотерапия» или «цитотоксический агент» используются взаимозаменяемо, если из контекста не следует иное.

В настоящем документе термин «химиотерапия» предназначен для обозначения специфических противоопухолевых химических агентов или лекарственных средств, которые «селективно» разрушают злокачественные клетки и ткани, например, алкилирующих агентов, антиметаболитов, в том числе ингибиторов тимидилатсинтазы, антрациклинов, агентов, оказывающих воздействие на микротрубочки, в том числе растительных алкалоидов, ингибиторов топоизомеразы, ингибиторов PARP и других противоопухолевых агентов. «Селективно» в этом контексте используется в широком

смысле, поскольку, разумеется, многие из этих агентов обладают серьезными побочными действиями.

Предпочтительная доза может быть выбрана лечащим врачом на основании природы рака, лечение которого проводят.

5 Примеры алкилирующих агентов, которые можно применять в способе согласно настоящему изобретению, включают алкилирующие агенты – азотистые иприты, нитрозомочевины, тетразины, азиридины, препараты платины и их производные, и неклассические алкилирующие агенты.

10 Пример химиотерапевтического агента, содержащего платину (также называемых препаратами платины), представляет собой цисплатин, карбоплатин, оксалиплатин, сатраплатин, пикоплатин, недаплатин, триплатин и липоплатин (липосомальный вариант цисплатина), в частности, цисплатин, карбоплатин и оксалиплатин.

15 Доза цисплатина составляет от приблизительно 20 до приблизительно 270 мг/м² в зависимости от конкретного ракового заболевания. Часто доза составляет от приблизительно 70 до приблизительно 100 мг/м².

20 Азотистые иприты включают мехлорэтамин, циклофосфамид, мелфалан, хлорамбуцил, ифосфамид и бусульфан. Нитрозомочевины включают N-нитрозо-N-метилмочевину (MNU), кармустин (BCNU), ломустин (CCNU) и семустин (MeCCNU), фотемустин и стрептозотозин. Тетразины включают дакарбазин, митозоломид и темозоломид.

 Азиридины включают тиотепу, митомицини диазиковон (AZQ).

25 Примеры антиметаболитов, которые можно применять в способе согласно настоящему изобретению, включают антифолаты (например, метотрексат и пеметрексед), аналоги пурина (например, тиопурины, например, азатиопурин, меркаптопурин, тиопурин, флударабин (включая фосфатную форму), пентостатин и кладрибин), аналоги пиримидина (например, фторпиримидины, например, 5-фторурацил и его пролекарства, например, капецитабин [Xeloda®]), флоксуридин, гемцитабин, цитарабин, децитабин, ралтитрексед (томудекс) гидрохлорид, кладрибин и 6-азаурацил.

30 Примеры антрациклинов, которые можно применять в способе согласно настоящему изобретению, включают даунорубицин (дауномицин), даунорубицин (липосомальный), доксорубицин (адриамицин), доксорубицин (липосомальный), эпирубицин, идарубицин, валрубицин, в настоящее время используемый только в лечении рака мочевого пузыря, и митоксантрон – аналог антрациклина, в частности, доксорубицин.

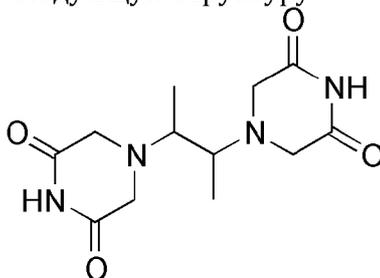
35 Примеры агентов, оказывающих воздействие на микротрубочки, которые можно применять в способе согласно настоящему изобретению, включают алкалоиды барвинка и таксаны.

 Алкалоиды барвинка включают полностью природные химические вещества, например, винкристин и винбластин, а также полусинтетические алкалоиды барвинка, например, винорелбин, виндезин и винфлунин.

40 Таксаны включают паклитаксел, доцетаксел, абраксан, карбазитаксел и их производные. Производные таксанов, применяемые в настоящем документе, включают препараты таксанов новой рецептуры, например, таксол, например, в мицеллярных

препаратах; производные также включают химические производные, где применяется химический синтез для модификации исходного вещества, представляющего собой таксан.

5 Ингибиторы топоизомеразы, которые можно применять в способе согласно настоящему изобретению, включают ингибиторы топоизомеразы I типа, ингибиторы топоизомеразы II типа и яды, действующие на топоизомеразу II типа. Ингибиторы I типа включают топотекан, иринотекан, индотекан и индимитекан. Ингибиторы II типа включают генистеин и ICRF 193, имеющий следующую структуру:



10 Яды II типа включают амсакрин, этопозид, фосфат этопозида, тенипозид, доксорубицин и фторхинолоны.

В одном из вариантов осуществления применяемая комбинация химиотерапевтических агентов представляет собой, например, препарат платины и 5-FU или его пролекарство, например, цисплатин или оксалиплатин, и капецитабин или гемцитабин, например, FOLFOX.

15 В одном из вариантов осуществления химиотерапия включает комбинацию химиотерапевтических агентов, в частности, цитотоксических химиотерапевтических агентов.

В одном из вариантов осуществления химиотерапевтическая комбинация включает препарат платины, например, цисплатин, и фторурацил или капецитабин.

20 В одном из вариантов осуществления химиотерапевтическая комбинация включает капецитабин и оксалиплатин (Xelox).

В одном из вариантов осуществления химиотерапия представляет собой комбинацию фолиниевой кислоты и 5-FU, необязательно в комбинации с оксалиплатином.

25 В одном из вариантов осуществления химиотерапия представляет собой комбинацию фолиниевой кислоты, 5-FU и иринотекана (FOLFIRI), необязательно в комбинации с оксалиплатином (FOLFIRINOX). Схема состоит из: иринотекана (180 мг/м² внутривенно в течение 90 минут) одновременно с фолиновой кислотой (400 мг/м² [или 2 x 250 мг/м²] внутривенно в течение 120 минут); затем фторурацила (400-500 мг/м² в виде в/в болюса), затем фторурацила (2400-3000 мг/м² в виде внутривенной инфузии в течение 46 часов). Этот цикл обычно повторяют раз в две недели. Показанные выше дозировки могут варьироваться от цикла к циклу.

30 В одном из вариантов осуществления химиотерапевтическая комбинация включает ингибитор микротрубочек, например, сульфат винкристина, эпотилон А, N-[2-[(4-гидроксифенил)амино]-3-пиридинил]-4-метоксибензолсульфонамид (ABT-751),
35 химиотерапевтический агент-производное таксола, например, паклитаксел, абраксан или доцетаксел, или их комбинацию.

В одном из вариантов осуществления комбинации включает ингибитор mTog. Примеры ингибиторов mTog включают эверолимус (RAD001), WYE-354, KU-0063794, рапамицин (сиролимус), темсиролимус, дефоролимус (МК-8669), AZD8055 и BEZ235(NVP-BEZ235).

5 В одном из вариантов осуществления комбинация включает ингибитор MEK. Примеры ингибиторов MEK включают AS703026, CI-1040 (PD184352), AZD6244 (селуметиниб), PD318088, PD0325901, AZD8330, PD98059, U0126-EtOH, BIX 02189 или BIX 02188.

10 В одном из вариантов осуществления комбинация включает ингибитор АКТ. Примеры ингибиторов АКТ включают МК-2206 и АТ7867.

В одном из вариантов осуществления комбинация включает ингибитор аврора-киназы. Примеры ингибиторов аврора-киназы включают ингибитор Aurora A I, VX-680, AZD1152-HQPA (барасертиб), мезилат SNS-314, PHA-680632, ZM-447439, CCT129202 и гесперадин.

15 В одном из вариантов осуществления комбинация включает ингибитор р38, например, описанный в заявке WO2010/038086, например, *N*-[4-({4-[3-(3-*мет*-бутил-1-*p*-толил-1*H*-пиразол-5-ил)уреидо]нафталин-1-илокси}метил)пиридин-2-ил]-2-метоксиацетамид.

В одном из вариантов осуществления комбинация включает ингибитор рi3K, например, выбранный из дактолисиба, пиктилисиба, LY294002, идеалалсиба, бупарлисиба, аутофиниба, серабелисиба, IP1-549, SF2534, GDC-0326, SAR405, TGR-1202, VPS34, GSK2269557, 740 Y-P, PI-103, NU7441, TGX-221, IC-87114, вортманнина, аналога XL147, ZSTK474, алпелисиба, AS-605240, PIK-75, 3-метиладенина, А66, воксталисиба, PIK-93, AZD6482, PF-04691502, апитолисиба, GSK105965, дувелисиба, TG100-115, AS-252424, BGT226, CUDU-907, 25 PIK-294, AS-604850, GSK2636771, копанлисиба, YM201636, CH5132799, CAY10505, PIK-293, TG100713, VS-5584, таселисиба, CZC24832, AMG319, GSK2292767, GDC-0084, HS-173, кверцетина, воксталисиба, GNE-317, LY3023414, VPS34-IN1, PIK-III, PI-3065, пиларалисиба, AZD8835, PF-4989216 и AZD8186.

30 В одном из вариантов осуществления комбинация включает ингибитор Bcl-2. Примеры ингибиторов Bcl-2 включают обатоклакс мезилат, АВТ-737, АВТ-263 (навитоклакс) и ТW-37.

В одном из вариантов осуществления химиотерапевтическая комбинация содержит антиметаболит, например, капецитабин (кселода), флударабин фосфат, флударабин (флудара), децитабин, ралтитрексед (томудекс), гидрохлорид гемцитабина и кладрибин.

35 В одном из вариантов осуществления комбинация содержит ганцикловир, который может способствовать контролю иммунных реакций и/или васкуляризации опухоли.

В одном из вариантов осуществления комбинация содержит ингибитор PARP.

40 В одном из вариантов осуществления терапевтический агент представляет собой ганцикловир, который может способствовать контролю иммунных реакций и/или васкуляризации опухоли.

В одном из вариантов осуществления один или более видов терапии, применяемых в способе согласно настоящему изобретению, являются метрономными, то есть представляют

собой непрерывное или часто проводимое лечение низкими дозами противораковых лекарственных средств, часто принимаемых одновременно с другими видами терапии.

Онколитические аденовирусы подгруппы В (в частности, Ad11 и его производные, такие как EnAd), могут обладать, в частности, синергическими характеристиками при применении с химиотерапевтическими средствами, поскольку, по-видимому, механизм их действия в значительной степени независим от апоптоза, и они уничтожают раковые клетки в основном за счет некролитического механизма. Кроме того, иммуносупрессия, имеющая место при химиотерапии, может позволять онколитическому вирусу выполнять свою функцию с большей эффективностью.

Терапевтическая доза в контексте настоящего документа относится к количеству вируса, такого как онколитический аденовирус, подходящему для достижения предполагаемого терапевтического эффекта при применении в подходящей схеме лечения, например, облегчающему симптомы или расстройства при заболевании, в частности, не вызывая дозозаменяющих побочных действий. Доза может считаться терапевтической дозой при лечении рака или метастазов, если число вирусных частиц может быть достаточным для обеспечения следующего: рост опухоли или метастазов замедляется или останавливается, или обнаруживается уменьшение размера опухоли или метастазирования, и/или увеличивается продолжительность жизни пациента. Подходящие терапевтические дозы обычно подбирают, исходя из баланса терапевтического эффекта и допустимой токсичности, например, так, чтобы побочные действия и токсичность были допустимыми с учетом пользы, достигаемой посредством терапии.

В одном из вариантов осуществления обеспечивается системное введение нескольких доз парентерального препарата онколитического аденовируса согласно настоящему изобретению в одном цикле лечения, например, где общая доза, вводимая при каждом введении, составляет от 1×10^{10} до 1×10^{14} вирусных частиц на дозу.

В одном из вариантов осуществления одну или более доз (например, каждую дозу) вируса или содержащей его композиции вводят так, чтобы скорость доставки вирусных частиц составляла от 2×10^{10} частиц в минуту до 2×10^{12} частиц в минуту.

В одном из вариантов осуществления вирус или терапевтическую конструкцию согласно настоящему изобретению (включая содержащий их препарат) вводят еженедельно, например, в течение 1 недели дозу вводят в 1, 3, 5 день, после чего вводят по одной дозе каждую следующую неделю.

В одном из вариантов осуществления вирус или терапевтическую конструкцию согласно настоящему изобретению (включая содержащий их препарат) вводят раз в две недели или раз в три недели, например, в течение 1 недели в 1, 3, 5 день, и в течение 2 или 3 недели также вводят в 1, 3 и 5 день. Указанный режим дозирования может быть повторен столько раз, сколько требуется.

В одном из вариантов осуществления препарат согласно настоящему изобретению (включая содержащий его препарат) вводят ежемесячно, например, в цикле лечения или в качестве поддерживающей терапии.

В одном из вариантов осуществления вирусы и конструкции согласно настоящему изобретению получают с применением технологии рекомбинантной ДНК. Специалисту в

данной области техники будет ясно, что вооруженный геном аденовируса может быть произведен другими техническими средствами, в том числе путем полного синтеза генома или плазмиды, содержащей часть генома или весь геном. Специалисту в данной области техники будет ясно, что в случае синтеза генома область инсерции может не содержать нуклеотидов сайта рестрикции, поскольку последние представляют собой артефакты от инсерции генов с применением способов клонирования.

В одном из вариантов осуществления вооруженный геном аденовируса полностью синтезирован.

В контексте данного описания термин «содержащий» следует толковать как «включающий».

Подразумевается, что варианты осуществления изобретения, включающие определенные признаки/элементы, также распространяются на альтернативные варианты осуществления, «состоящие» или «по существу состоящие» из релевантных элементов/признаков.

В технически допустимых случаях варианты осуществления изобретения могут быть скомбинированы. Технические источники, такие как патенты и патентные заявки, включены в настоящий документ посредством ссылки.

Любые варианты осуществления, конкретным и явным образом изложенные в настоящем документе, могут составлять основу изменения путем отказа, по отдельности или в комбинации с одним или более дополнительных вариантов осуществления.

Заголовки в данном документе используются для разделения документа на разделы, и не предназначены для использования для толкования смысла раскрытого изобретения.

Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании заявки GB 1801614.7, поданной 31 января 2018 г. и включенной в настоящий документ посредством ссылки. Приоритетная заявка может использоваться в качестве оснований для корректировки настоящей заявки.

Настоящее изобретение дополнительно описано, исключительно в иллюстративных целях, в приведенных ниже примерах.

Краткое описание графических материалов

На фиг. 1 показаны результаты экспериментов, где сравнивается стабильность аденовирусов группы В в разных буферах в диапазоне различных значений pH. **(А)** стабильность аденовирусов, хранившихся при 2-8 в течение 20 месяцев **(В)** стабильность аденовирусов группы В, хранившихся при 25 °С в течение 8 недель.

На фиг. 2 приведены результаты экспериментов по определению влияния глицерина на стабильность аденовирусов группы В. **(А)** графики демонстрируют стабильность аденовирусов группы В на 0 неделе, 7 неделе и 17 неделе в диапазоне различных концентраций глицерина от 8 до 20%. **(В)** график, демонстрирующий роль глицерина в полидисперсности в течение 7 недель. **(С)** график, демонстрирующий % изменения концентрации аденовирусов группы В в препаратах, содержащих 0%, 10% и 20% глицерина, по данным анализа ВЭЖХ.

- На фиг. 3** показаны результаты экспериментов по определению вклада в стабильность аденовирусов группы В, вносимого этанолом/аргинином/метионином/полисорбатом. **(А)** график, демонстрирующий активность аденовируса группы В в зависимости от времени для разных буферов. **(В)** график, демонстрирующий концентрацию аденовирусов группы В в зависимости от времени для разных буферов. **(С)** график, демонстрирующий концентрацию контрольного препарата, содержащего глицерин, буфер НЕРЕС, этанол, аргинин, метионин и полисорбат, в зависимости от времени.
- На фиг. 4** приведены результаты экспериментов, демонстрирующих влияние этанола, аргинина и метионина на активность аденовирусов при долгосрочном хранении при 4 °С. **(А)** демонстрирует активность аденовируса группы В в 5 мМ НЕРЕС с 20% глицерина **(В)** график, демонстрирующий влияние на относительную активность при включении в состав препарата этанола. **(С)** график, демонстрирующий влияние на относительную активность при включении в состав препарата этанола и метионина. **(D)** график, демонстрирующий влияние на относительную активность при включении в состав препарата этанола, метионина и аргинина. **(Е)** график, демонстрирующий концентрацию аденовирусов в зависимости от времени для препаратов, протестированных на фиг. 4В-4D.
- На фиг. 5** показаны результаты экспериментов по оценке влияния полисорбата на стабильность аденовирусов. **(А)** график, демонстрирующий активность аденовирусов в зависимости от времени при включении в состав препарата 0,115% полисорбата по сравнению с 0,15% полисорбата. **(В)** график, демонстрирующий концентрацию аденовирусов в зависимости от времени при включении в состав препарата 0,115% полисорбата по сравнению с 0,15% полисорбата.
- На фиг. 6** показаны результаты экспериментов по оценке стабильности аденовирусов, хранившихся в различных препаратах при 25 °С в течение 10 недель. **(А)** активность аденовирусов, хранившихся в различных препаратах в течение 10 недель при 25 °С. **(В)** концентрация аденовирусов, хранившихся в различных препаратах в течение 10 недель при 25 °С.
- На фиг. 7** показано относительное время удерживания Ad5 (вирус группы С) и Ad11 (вирус группы В), полученное с помощью анионообменной хроматографии.
- На фиг. 8А** показан анализ относительной онколитической активности (20% глицерина, 1,4% этанола, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина) при хранении при 4 °С.
- На фиг. 8В** показано отношение общее содержание вируса:инфекционные вирусные частицы (20% глицерина, 1,4% этанола, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина) при хранении при 4 °С.
- На фиг. 8С** показан анализ относительной онколитической активности (20% глицерина, 1,4% этанола, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина).
- На фиг. 8D** показана концентрация вируса, полученная с помощью анионообменной ВЭЖХ (20% глицерина, 1,4% этанола, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина)

На **фиг. 8Е** показано отношение общее содержание вируса:инфекционные вирусные частицы (20% глицерина, 1,4% этанола, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина)

ПОСЛЕДОВАТЕЛЬНОСТИ

SEQ ID NO: 1 акцептор сплайсинга (SA); **SEQ ID NO: 2** акцептор точки разветвления сплайсинга (BSA); **SEQ ID NO: 3** последовательность участка внутренней посадки рибосомы (IRES); **SEQ ID NO: 4** последовательность полиаденилирования **SEQ ID NO: 5** Последовательность ДНК ВХ, соответствующая и включающая п.н. 28166-28366 генома EnAd; **SEQ ID NO: 6** последовательность ДНК ВУ, соответствующая и включающая п.н. 29345-29379 генома EnAd; **SEQ ID NO: 7** лидерная последовательность; **SEQ ID NO: 8** лидерная последовательность; **SEQ ID NO: 9** пептид Р2А; **SEQ ID NO: 10** пептид F2А; **SEQ ID NO: 11** пептид E2А; **SEQ ID NO: 12** пептид 2А; **SEQ ID NO: 13** геном EnAd; **SEQ ID NO: 14** последовательность генома вируса NG-73; **SEQ ID NO: 15** последовательность генома вируса NG-74; **SEQ ID NO: 16** последовательность генома вируса NG-76; **SEQ ID NO: 17** последовательность генома вируса NG-77; **SEQ ID NO: 18** последовательность генома вируса NG-78; **SEQ ID NO: 19** последовательность генома вируса NG-92; **SEQ ID NO: 20** последовательность генома вируса NG-95; **SEQ ID NO: 21** последовательность генома вируса NG-96; **SEQ ID NO: 22** последовательность генома вируса NG-97; **SEQ ID NO: 23** последовательность генома вируса NG-134; **SEQ ID NO: 24** последовательность генома вируса NG-135; **SEQ ID NO: 25** последовательность генома вируса NG-139, состоящая из трансгенной кассеты, кодирующей цитокин, TNF α , вставленной в область ВУ; **SEQ ID NO: 26** последовательность вирусного генома, состоящая из трансгенной кассеты, кодирующей полноразмерное антитело к VEGF, вставленной в область ВУ. Трансгенная кассета содержит SSA, последовательность тяжелой цепи ab с 5'-лидерной последовательностью, SSA и последовательность легкой цепи ab; **SEQ ID NO: 27** последовательность вирусного генома, состоящая из трансгенной кассеты, кодирующей полноразмерное антитело к VEGF, вставленной в область ВУ; **SEQ ID NO: 28** последовательность генома вируса NG-165, состоящая из трансгенной кассеты, кодирующей полноразмерное антитело к VEGF, вставленной в область ВУ; **SEQ ID NO: 29** последовательность генома вируса NG-167, состоящая из трансгенной кассеты, кодирующей ScFv к VEGF с С-концевой меткой His6, вставленной в область ВУ; **SEQ ID NO: 30** последовательность генома вируса NG-177, состоящая из трансгенной кассеты, кодирующей полноразмерное антитело к PD-L1, вставленной в область ВУ; **SEQ ID NO: 31** последовательность генома вируса NG-185, состоящая из генома EnAd с уникальными сайтами рестрикции, вставленными в области ВХ и ВУ; **SEQ ID NO: 32** последовательность генома вируса NG-190, состоящая из трансгенной кассеты, кодирующей полноразмерное антитело к PD-L1, вставленной в область ВУ; **SEQ ID NO: 33** последовательность генома вируса NG-217, состоящая из трансгенной кассеты, кодирующей опухолеассоциированный антиген, NY-ESO-1, вставленной в область ВУ; **SEQ ID NO: 34** последовательность генома вируса NG-220, состоящая из трансгенной кассеты, кодирующей опухолеассоциированный антиген, NY-ESO-1, вставленной в область ВУ; **SEQ ID NO: 35** последовательность генома вируса NG-221, состоящая из генома EnAd с трансгенной кассетой, кодирующей ScFv к PD-L1 с С-концевой меткой His6, вставленной в область ВУ; **SEQ ID NO: 36** последовательность генома вируса NG-242, состоящая из трансгенной кассеты,

кодирующей полноразмерное антитело к CTLA-4, вставленной в область BY; **SEQ ID NO: 37** последовательность генома вируса NG-257, содержащая геном EnAd с трансгенной кассетой, кодирующей ScFv к VEGF, вставленной в область BX; **SEQ ID NO: 38** последовательность генома вируса NG258, состоящая из трансгенной кассеты, кодирующей полноразмерное антитело к VEGF, вставленной в область BY; **SEQ ID NO: 39** последовательность генома вируса NG-272, содержащая геном EnAd с трансгенной кассетой, кодирующей ScFv к VEGF и ScFv к PD-L1, вставленной в область BY; **SEQ ID NO: 40** последовательность генома вируса NG-280, состоящая из трансгенной кассеты, кодирующей натрий-йодидный симпортер (NIS), вставленной в область BY; **SEQ ID NO: 41** последовательность генома вируса NG-281, содержащая геном EnAd с трансгенной кассетой, кодирующей ScFv к VEGF, вставленной в область Bx, и второй трансгенной кассетой, кодирующей ScFv к PD-L1, вставленной в область BY; **SEQ ID NO: 42** последовательность генома вируса NG-330, содержащая геном EnAd с трансгенной кассетой, кодирующей антиген активации Т-лимфоцитов, CD80, вставленной в область BY. Трансгенная кассета содержит 5'-SSA, последовательность кДНК человеческого CD80 и 3'-поли(A) последовательность; **SEQ ID NO: 43** последовательность генома вируса NG-343, содержащая геном EnAd с трансгенной кассетой, кодирующей IFN α и CD80, вставленной в область BY. Трансгенная кассета содержит 5'-SSA, последовательность кДНК IFN α , пептид P2A, последовательность кДНК CD80 и 3'-поли(A) последовательность; **SEQ ID NO: 44** геном NG-641; **SEQ ID NO: 45** последовательность генома вируса NG-345, содержащая геном EnAd с трансгенной кассетой, кодирующей лиганд Flt3, MIP1 α и IFN α , вставленной в область BY. Трансгенная кассета содержит 5'-SSA, последовательность кДНК лиганда Flt3, последовательность пептида P2A, последовательность кДНК MIP1 α , последовательность пептида T2A, последовательность кДНК IFN α и 3'-поли(A) последовательность; **SEQ ID NO: 46** последовательность генома вируса NG-346, содержащая геном EnAd с трансгенной кассетой, кодирующей лиганд Flt3, MIP1 α и CD80, вставленной в область BY. Трансгенная кассета содержит 5'-SSA, последовательность кДНК лиганда Flt3, последовательность пептида P2A, последовательность кДНК MIP1 α , последовательность пептида T2A, последовательность кДНК CD80 и 3'-поли(A) последовательность; **SEQ ID NO: 47** последовательность генома вируса NG-347, содержащая геном EnAd с трансгенной кассетой, кодирующей IFN α , MIP1 α и CD80, вставленной в область BY. Трансгенная кассета содержит 5'-SSA, последовательность кДНК IFN α , последовательность пептида P2A, последовательность кДНК MIP1 α , последовательность пептида T2A, последовательность кДНК CD80 и 3'-поли(A) последовательность; **SEQ ID NO: 48** последовательность генома вируса NG-348, содержащая геном EnAd с трансгенной кассетой, кодирующей закрепленную на мембране химерную форму одноцепочечного Fv к человеческому CD3 ϵ и антигена активации Т-лимфоцитов, CD80, вставленной в область BY. Трансгенная кассета содержит 5'-SSA, закрепленную на мембране последовательность кДНК антитела к CD3 ϵ , пептид P2A, последовательность кДНК человеческого CD80 и 3'-поли(A) последовательность; **SEQ ID NO: 49** последовательность генома вируса NG-348A, содержащая геном EnAd с трансгенной кассетой, кодирующей закрепленную на мембране химерную форму одноцепочечного Fv к человеческому CD3 ϵ с С-концевой меткой V5 и антиген активации Т-лимфоцитов, CD80, вставленной в область BY. Трансгенная кассета содержит 5'-SSA, закрепленную на мембране последовательность кДНК

антитела к CD3E, метку V5, пептид P2A, последовательность кДНК человеческого CD80 и 3'-поли(A) последовательность; **SEQ ID NO: 50** последовательность генома NG-350A; **SEQ ID NO: 51** последовательность генома вируса NG-420, содержащая геном EnAd с трансгенной кассетой, кодирующей закрепленную на мембране химерную форму одноцепочечного Fv к человеческому CD3e, вставленной в область ВУ. Трансгенная кассета содержит 5'-SSA, закрепленную на мембране последовательность кДНК антитела к CD3E, и 3'-поли(A) последовательность; **SEQ ID NO: 52** последовательность генома вируса NG-420A, содержащая геном EnAd с трансгенной кассетой, кодирующей закрепленную на мембране химерную форму одноцепочечного Fv к человеческому CD3e и С-концевую метку V5, вставленную в область ВУ. Трансгенная кассета содержит 5'-SSA, закрепленную на мембране последовательность кДНК антитела к CD3E, последовательность метки V5 и 3'-поли(A) последовательность; **SEQ ID NO: 53** NG-601 (EnAd-CMV-EpCAMBiTE); **SEQ ID NO: 54** NG-602 (EnAd-SA-EpCAMBiTE); **SEQ ID NO: 55** NG-605 (EnAd-CMV-FAPBiTE); **SEQ ID NO: 56** NG-606 (EnAd-SA-FAPBiTE); **SEQ ID NO: 57** геном NG-611; **SEQ ID NO: 58** геном NG-612; **SEQ ID NO: 59** геном NG-613; **SEQ ID NO: 60** геном NG-614; **SEQ ID NO: 61** геном NG-615; **SEQ ID NO: 62** геном NG-616; **SEQ ID NO: 63** геном NG-617; **SEQ ID NO: 64** геном NG-618; **SEQ ID NO: 65** геном NG-640.

ПРИМЕРЫ

20 **Пример 1 – Тестирование влияния pH на стабильность препаратов аденовирусов**

Был проведен эксперимент по определению влияния pH на стабильность препаратов аденовирусов группы В. Были протестированы различные буферы: карбонатный/бикарбонатный, диэтноламин, Gly-NaCl, HEPES, меглумин, борат натрия и буфер Tris. Каждый буфер получали с диапазоном различных значений pH: 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 и 10,0. Каждый буфер также содержал глицерин, этанол, аргинин, метионин и полисорбат. EnAd суспендировали в каждом из буферов и хранили препараты при 4 °С. Образцы из каждого препарата отбирали через равные промежутки времени, и стабильность аденовирусов в каждом препарате определяли путем измерения концентрации вирусной ДНК в образце с применением ВЭЖХ. Более низкая концентрация ДНК была весомым показателем более высоких уровней разложения вируса и, следовательно, более низкой стабильности.

30 Результаты эксперимента показаны на фиг. 1А и 1В. Как видно из фиг. 1А, pH оказывает существенное влияние на стабильность аденовирусов. Пиковая стабильность наблюдалась при pH 9,0, и она заметно падала, когда pH падал до 8,0 или повышался до 10,0. Аналогичный эффект также наблюдался при кратковременном (до 8 недель) хранении при 25 °С (фиг. 1В).
35 Важно отметить, что, хотя существуют небольшие различия в стабильности между различными буферами, влияние pH было гораздо более важным, и препараты, больше всего отклонявшиеся от 9,0 pH, имели самую низкую стабильность независимо от того, какой буфер применялся в препарате. Таким образом, результаты показывают, что pH от 8,5 до 9,5 обеспечивает наилучшую стабильность.

40 **Пример 2 – Тестирование влияния глицерина на стабильность препаратов аденовирусов**

Была проведена серия экспериментов по определению влияния на стабильность препаратов аденовирусов группы В при включении в состав препарата глицерина. Глицерин подвергали скринингу в комбинации с применением анализа методом Definitive Screening Design (DSD) в трех концентрациях: 9%, 14% и 20%. Результаты были проанализированы с применением статистического программного обеспечения SAS JMP. Модель была создана на основе данных DSD. Каждый препарат также содержал 10 мМ HEPES. Аденовирусы суспендировали в каждом препарате и хранили препараты при 4 °С в течение 17 недель. Стабильность препаратов оценивали через 0, 7 и 17 недель путем измерения концентрации вирусной ДНК в образцах с применением ВЭЖХ.

Результаты показаны на фиг. 2А. Как можно видеть, существует четкая корреляция между концентрацией глицерина и стабильностью, причем препараты, имеющие более высокие концентрации глицерина, имеют более высокую стабильность. Этот эффект, по-видимому, уменьшается при приблизительно 17-20% концентрации глицерина, что дает основания полагать, что выход за пределы 20% глицерина вряд ли окажет значительное влияние на стабильность. Таким образом, эти результаты дают основания полагать, что концентрация глицерина от 15 до 20% значительно повысит стабильность, и что концентрация от 19 до 20%, вероятно, даст наилучшие результаты.

На фиг. 2В и 2С показаны результаты дополнительных исследований, в которых препараты с 0%, 10% и 20% глицерина оценивали после хранения при 37 °С (фиг. 2В) и хранения при 25 °С. На фиг. 2В показано, что полидисперсность (которая является мерой распределения молекулярной массы в растворе – более высокая полидисперсность коррелирует с более высоким разложением аденовирусов группы В) была значительно выше, когда глицерин был исключен из препарата, по сравнению с препаратом, в который было добавлено 10% или 20% глицерина. На фиг. 2С показан % изменения концентрации аденовируса группы В в зависимости от времени и отчетливо показано более крутое и более резкое снижение уровней концентрации, когда глицерин не использовали, по сравнению с препаратами, в которые было добавлено 10% или 20% глицерина. Следовательно, эти результаты также подтверждают результаты, представленные на фиг. 2А, то есть то, что включение глицерина в препараты оказывает значительное влияние на стабильность.

Пример 3 – Тестирование влияния добавления этанола/аргинина/метионина/полисорбата на стабильность препаратов аденовирусов группы В

Была проведена серия экспериментов для определения влияния на стабильность препаратов аденовирусов группы В при исключении из состава препаратов этанола/аргинина/метионина/полисорбата. Был протестирован ряд различных буферов: HEPES 5 мМ, меглумин 10 мМ, TRIS 10 мМ и Gly-NaCl 10 мМ. Ни один из препаратов не содержал этанола, аргинина, метионина или полисорбата. Аденовирусы группы В суспендировали в каждом препарате и хранили препараты при 4 °С в течение 9 месяцев. Стабильность и активность препаратов оценивали соответственно с помощью ВЭЖХ и MTS (анализ жизнеспособности клеток, в котором оценивают способность аденовирусов осуществлять лизис клеток) с 3-месячными интервалами, то есть в 0 месяцев, 3 месяца, 6 месяцев и 9 месяцев.

На фиг. 3А показана активность аденовирусов группы В в течение 9-месячного периода хранения. Как можно видеть, наблюдается значительное разложение аденовирусов группы В в течение этого периода времени, причем большинство препаратов приближается к активности 0 ЕД/в.ч. к 9-месячной отметке. Заметным исключением является препарат, содержащий меглумин, но даже этот препарат не избежал значительного падения до приблизительно 0,5 ЕД/в.ч. от исходного уровня в 1 ЕД/в.ч., то есть активность аденовирусов группы В в препарате уменьшилась вдвое через 9 месяцев. Этот результат дает основания полагать, что меглуминовый буфер был лучшим в сохранении активности аденовирусов группы В, а также подчеркивает важность включения в состав препаратов этанола, аргинина, метионина и полисорбата.

На фиг. 3В показаны уровни концентрации аденовирусов группы В в течение 9-месячного периода и снова показана тенденция, при которой наблюдается значительное снижение концентрации в течение 9-месячного периода для всех протестированных препаратов. Для сравнения, на фиг. 3С показана концентрация аденовирусов группы В в препарате, содержащем этанол/аргинин/метионин/полисорбат. Необходимо отметить стабильные концентрации аденовируса группы В, наблюдаемые даже после 20 месяцев хранения при 4 °С. Основываясь на данных, показанных на фиг. 3В, по меньшей мере в отношении уровней концентрации буфер TRIS, по-видимому, показал наилучшие результаты. Этот эксперимент также показывает, что эти компоненты важны для общей стабильности препаратов.

Пример 4 – Тестирование индивидуального влияния этанола, аргинина и метионина на стабильность препаратов аденовирусов

По результатам примера 3 были проведены дополнительные эксперименты в попытке определить относительное влияние каждого из этанола, аргинина и метионина на стабильность препаратов аденовирусов группы В при долгосрочном хранении (24 месяца) при 4 °С.

Результаты анализов MTS показаны на фиг. 4. Были протестированы три различных препарата, первый из которых содержал 1% этанола (фиг. 4А), второй – 1% этанола и 0,15 мМ метионина (фиг. 4С), а третий – 1% этанола, 0,15 мМ метионина и 10 мМ аргинина (фиг. 4В). Все протестированные препараты содержали 5 мМ HEPES, 17% глицерина и имели pH 8,0.

Результаты дают основания полагать, что активность аденовирусов группы В сохраняется всеми тремя компонентами по сравнению с контрольным препаратом, содержащим только HEPES и глицерин и не содержащим ни одного из этих компонентов. Активность контрольного препарата снизилась до 0,5 ЕД/в.ч. в течение 3 месяцев, тогда как фиг. 4А-4С показывают, что период стабильности значительно увеличивается при добавлении 3 указанных компонентов. В частности, результаты дают основания полагать, что добавление этанола увеличивает стабильность препарата приблизительно на 6 месяцев, добавление этанола и метионина улучшает стабильность приблизительно на 15 месяцев, а добавление этанола, метионина и аргинина улучшает стабильность приблизительно на 12 месяцев. Соответственно, эти результаты показывают, что все из этанола, метионина и аргинина способствуют стабильности.

На фиг. 4D показаны уровни концентрации аденовируса, определенные с помощью ВЭЖХ, и она дает основания полагать, что концентрация вируса остается приблизительно постоянной

для всех 3 препаратов в течение 24-месячного периода хранения. Возможно, это говорит о том, что этанол оказывает наибольшее влияние, учитывая, что этанол присутствует во всех трех препаратах.

Пример 5 – Тестирование влияния полисорбата на стабильность препаратов аденовирусов группы В

В этом примере описаны результаты эксперимента по оценке важности полисорбата для стабильности препарата аденовируса при долгосрочном хранении (20 месяцев) при 4 °С.

Были испытаны два препарата, один из которых содержал 0,115% полисорбата 80, а другой – 0,15% полисорбата 80. Оба препарата также содержали 20% глицерина, 5 мМ HEPES, 1,5% этанола, 10 мМ аргинина, 0,2 мМ метионина и имели pH 8,0.

Результаты эксперимента показаны на фиг. 5А и 5В. На фиг. 5А показано, что активность препаратов постепенно падает до приблизительно 0,5 ЕД/в.ч. вблизи 10-месячной отметки для препарата, содержащего 0,15% полисорбата, но затем остается стабильной при 0,5 ЕД/в.ч. вплоть до 20-месячной отметки. Следовательно, полисорбат, по-видимому, вносит значительный вклад в сохранение активности аденовируса в препаратах. Падение активности аналогично для препарата, содержащего 0,115%. Это дает основания полагать, что включение полисорбата на уровне 0,1% приводит к получению препарата с хорошей стабильностью.

На фиг. 5В показаны уровни концентрации аденовируса, определенные с помощью ВЭЖХ, и она дает основания полагать, что концентрация вируса остается достаточно постоянной в обоих препаратах в течение 20-месячного периода хранения.

Пример 6 – Тестирование различных буферов и их влияния на стабильность препаратов аденовирусов группы В

В этом примере описаны результаты эксперимента по сравнению стабильности различных буферов при применении в препаратах аденовирусов группы В при краткосрочном хранении (11 недель) при 25 °С.

Было протестировано 7 различных препаратов: Gly-NaCl при pH 9,0, TRIS при pH 8,0, TRIS при pH 8,8, меглумин при pH 8,0, меглумин при pH 8,5, меглумин при pH 9,0 и HEPES при pH 8,0. Все препараты содержали 20% глицерина, 1,4% этанола, 15 мМ аргинина, 0,15 или 0,25 мМ метионина, 0,15% полисорбата.

Результаты показаны на фиг. 6А и 6В. На фиг. 6А показано отношение активности (100 ррс/RS) в зависимости от времени, а на фиг. 6В показана концентрация (в.ч./мл) препаратов в зависимости от времени. Основываясь на графиках, приблизительный порядок увеличения стабильности препаратов выглядит как HEPES, TRIS, Gly-NaCl и меглумин (лучше всего).

Пример 7

Был проведен эксперимент, чтобы подтвердить, что условия, выявленные с применением методов скрининга в условиях ускоренного разложения, могут быть перенесены на долгосрочное хранение при 4 °С, с более широким набором методов определения стабильности. Был испытан ряд различных буферов, все при 10 мМ: меглумин pH 8,0, меглумин pH 8,5, меглумин pH 9,0, TRIS pH 8,5 и Gly-NaCl. Все препараты содержали 20% глицерина, 1,4% этанола, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина. Препараты аденовирусов группы В хранили как при 4 °С, так и при -80 °С в течение 12 месяцев. Стабильность и

активность препаратов, хранившихся при 4 °С, оценивали с помощью анионообменной ВЭЖХ (концентрация вируса), MTS (анализ жизнеспособности клеток, в котором оценивают способность аденовируса осуществлять лизис клеток) и анализа инфицирующей способности (оценивает способность аденовируса инфицировать клетки и начинать репликацию) через равные промежутки времени. Через 12 месяцев образцы, хранившиеся при -80 °С и 4 °С, анализировали вместе, используя одни и те же методы.

Результаты периодического анализа аденовируса, хранившегося при 4 °С, показаны на фиг. 8А и 8В. MTS (относительная онколитическая активность) на фиг. 8А показывает, что аденовирус, хранившийся при рН 8,0, более стабилен в течение более длительного времени, чем при хранении в буферах с рН 8,5 и рН 9,0. Это подтверждается альтернативным анализом, как показано на фиг. 8В; отношение неинфекционных частиц, присутствующих при хранении при 4 °С, увеличивается раньше при повышении рН. При рН 8,0 при наличии вспомогательных веществ (глицерин, метионин, аргинин и этанол) аденовирус наиболее стабилен при хранении.

На фиг. 8С, 8D и 8Е сравнивается аденовирус, хранившийся при 4 °С, с аденовирусом, хранившимся при -80 °С в течение того же периода времени. На всех фигурах контроль с глицерином забуферен при рН 7,8 и содержит 20% глицерина и никаких других вспомогательных веществ. Фиг. 8D подтверждает, что изменения в концентрации аденовируса отсутствуют, как обнаружено с помощью анионообменной ВЭЖХ в любом из протестированных препаратов при любой температуре. На фиг. 8С сравнивается относительная онколитическая активность (MTS) аденовируса, хранившегося при обоих температурных условиях. Наличие одного или нескольких вспомогательных веществ (этанол, аргинин или метионин) стабилизировало активность аденовируса при хранении при 4 °С по сравнению с -80 °С. При наличии всех вспомогательных веществ стабильность аденовируса, измеренная по активности, при 4 °С была наибольшей при рН 8,0, при этом стабильность снижалась при повышении рН. Результаты на фиг. 8Е, где сравнивается скорость образования неинфекционных частиц при хранении, подтверждают результат по онколитической активности (MTS).

Хранение вируса при 4 °С в течение 12 месяцев подтвердило, что наличие одного или нескольких вспомогательных веществ (метионина, аргинина, этанола и глицерина) улучшало стабильность аденовируса. Результаты также подтвердили, что поддержание рН было существенно для стабильности аденовируса при хранении при 4 °С. В этом эксперименте оптимальное значение рН для стабильности составило 8,0, и стабильность снижалась с увеличением рН. В примере 1 данные показали, что рН > 8,0 будет обеспечивать более высокую стабильность, с оптимальным значением при 8,5-9,0. Однако единственным буфером, испытанным при рН 8,0, был НЕРЕС. Таким образом, можно сделать вывод, что меглумин, буферный агент на основе сахара, оказывает большее стабилизирующее действие на аденовирус при рН 8,0 по сравнению с буфером НЕРЕС, который применялся в примере 1.

Формула изобретения

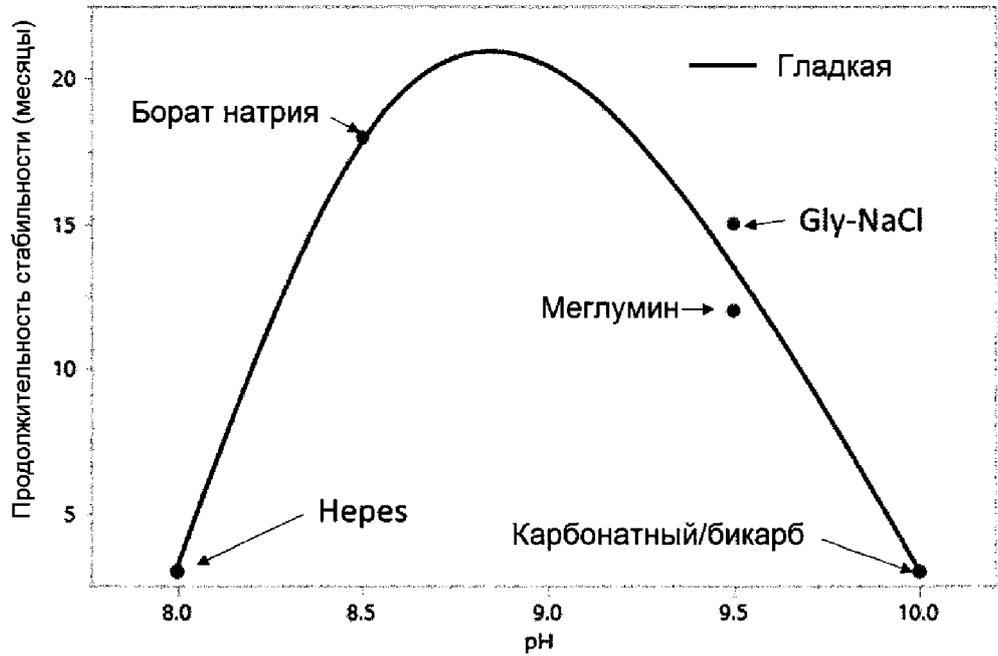
1. Жидкий препарат, подходящий для аденовируса группы В, содержащий:
 - а) аденовирус группы В, такой как репликационно компетентный аденовирус группы В,
 - б) от 15 до 25 % об./об. глицерина, например, 16, 17, 18, 19, 20, 21 % об./об. глицерина; и
 - с) от 0,1 до 1,5 % об./об. этанола, например, 0,2-1 % об./об., например, 1 % об./об. этанола;
 - д) буфер,где рН препарата составляет от 8,0 до 9,6, например, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4 или 9,5.
2. Препарат по п. 1, предназначенный для внутривенного введения.
3. Препарат по п. 2, предназначенный для введения путем медленной инъекции.
4. Препарат по п. 2, предназначенный для введения путем инфузии.
5. Препарат по любому из пп. 1-4, дополнительно содержащий поверхностно-активное вещество, например, неионогенное поверхностно-активное вещество.
6. Препарат по п. 5, дополнительно содержащий полисорбат, например, полисорбат 20, 40, 60 или 80, например, 0,05-0,15% полисорбата 20, 40, 60 или 80.
7. Препарат по п. 6, содержащий полисорбат 80, например, 0,05-0,15% полисорбата 80, например, 0,115% полисорбата 80.
8. Препарат по любому из пп. 1-7, дополнительно содержащий метионин, например, 0,01-0,3 мМ, например, 0,01-0,3, например, 0,25 мМ метионина.
9. Препарат по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащий аргинин, например, от 5 до 20 мМ, например, 15 мМ аргинина.
10. Препарат по любому из пп. 1-9, где буфер выбран из меглумина, глицина (такого как Gly-NaCl), TRIS и комбинаций двух или более из них.
11. Препарат по п. 10, содержащий меглуминовый буфер.
12. Препарат по любому из пп. 1-11, не содержащий буфер НЕРЕС.
13. Препарат по любому из пп. 1-12, содержащий:
 - а) 15-20 % об./об. глицерина;
 - б) 1-1,5 % об./об. этанола;
 - с) 0,1-0,2 % об./об. полисорбата 80;
 - д) 0,2-0,3 мМ метионина;
 - е) 10-20 мМ аргинина; и
 - ф) буфер, такой как меглумин;где рН препарата составляет от 8,0 до 9,6, например, 8.

Формула изобретения
(для рассмотрения на рег. фазе в ЕАПВ)

1. Жидкий препарат, подходящий для аденовируса группы В, содержащий:
 - a) аденовирус группы В, такой как репликационно компетентный аденовирус группы В,
 - b) от 15 до 25 % об./об.глицерина, например, 16, 17, 18, 19, 20, 21 % об./об.глицерина; и
 - c) от 0,1 до 1,5 % об./об.этанола, например, 0,2-1 об.%, например, 1 % об./об.этанола;
 - d) буфер,где:
рН препарата составляет от 8,0 до 9,6, например, 8,0, 8,1, 8,2, 8,3, 8,4, 8,5, 8,6, 8,7, 8,8, 8,9, 9,0, 9,1, 9,2, 9,3, 9,4 или 9,5, и
препарат не содержит сахар.
2. Препарат по п. 1, предназначенный для внутривенного введения.
3. Препарат по п. 2, предназначенный для введения путем медленной инъекции.
4. Препарат по п. 2, предназначенный для введения путем инфузии.
5. Препарат по любому из пп. 1-4, дополнительно содержащий поверхностно-активное вещество, например, неионогенное поверхностно-активное вещество.
6. Препарат по п. 5, дополнительно содержащий полисорбат, например, полисорбат 20, 40, 60 или 80, например, 0,05-0,15% полисорбата 20, 40, 60 или 80.
7. Препарат по п. 6, содержащий полисорбат 80, например, 0,05-0,15% полисорбата 80, например, 0,115% полисорбата 80.
8. Препарат по любому из пп. 1-7, дополнительно содержащий метионин, например, 0,01-0,3 мМ, например, 0,01-0,3, например, 0,25 мМ метионина.
9. Препарат по любому из пп. 1-8, дополнительно содержащий аргинин, например, от 5 до 20 мМ, например, 15 мМ аргинина.
10. Препарат по любому из пп. 1-9, где буфер выбран из меглумина, глицина (такого как Gly-NaCl), TRIS и комбинаций двух или более из них.
11. Препарат по п. 10, содержащий меглуминовый буфер.
12. Препарат по любому из пп. 1-11, не содержащий буфер НЕРЕС.
13. Препарат по любому из пп. 1-12, содержащий:
 - a) 15-20 % об./об.глицерина;
 - b) 1-1,5 % об./об.этанола;
 - c) 0,1-0,2 % об./об.полисорбата 80;
 - d) 0,2-0,3 мМ метионина;
 - e) 10-20 мМ аргинина; и
 - f) буфер, такой как меглумин;где рН препарата составляет от 8,0 до 9,6, например, 8.

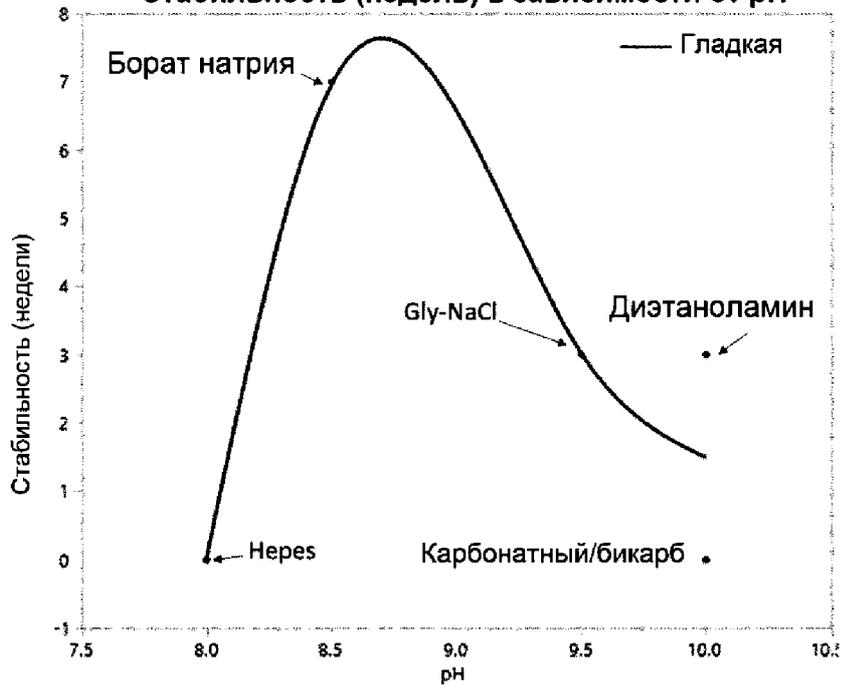
А Хранение при 2-8 °С

Продолжительность стабильности (месяцы) в зависимости от рН



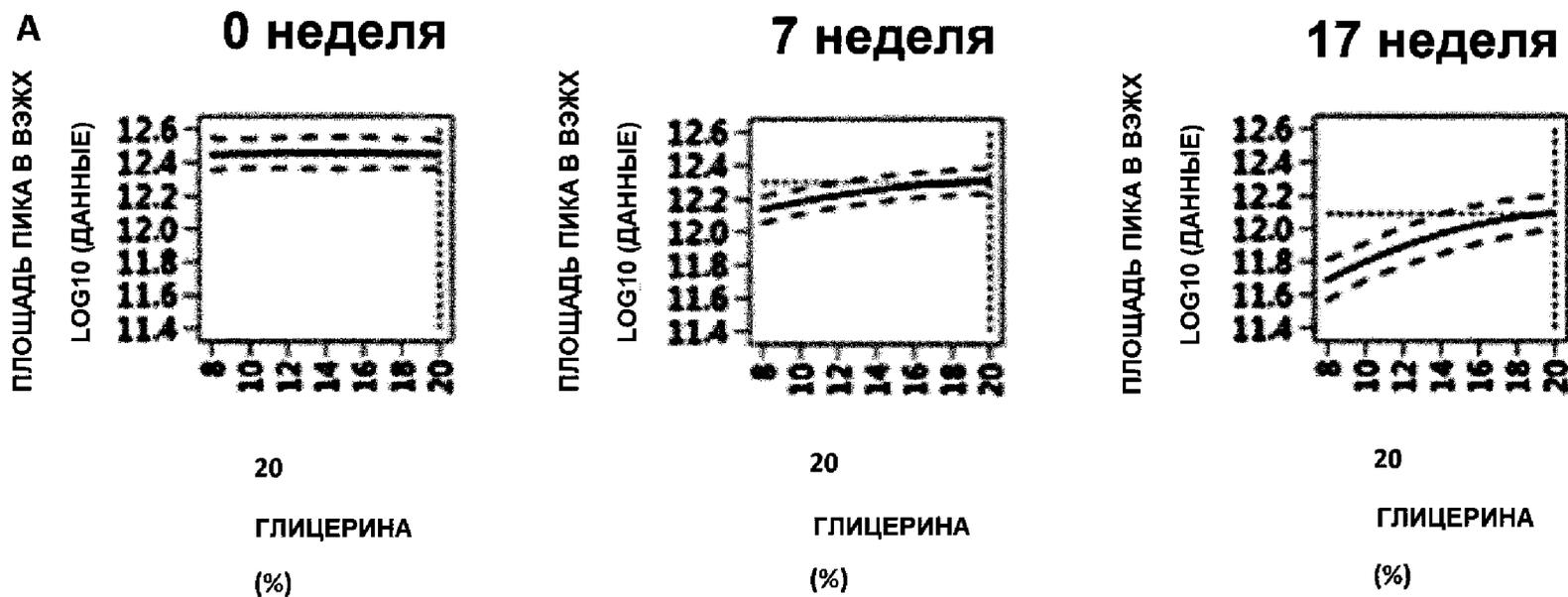
В Условия ускоренного разложения, 25 °С

Стабильность (недели) в зависимости от рН



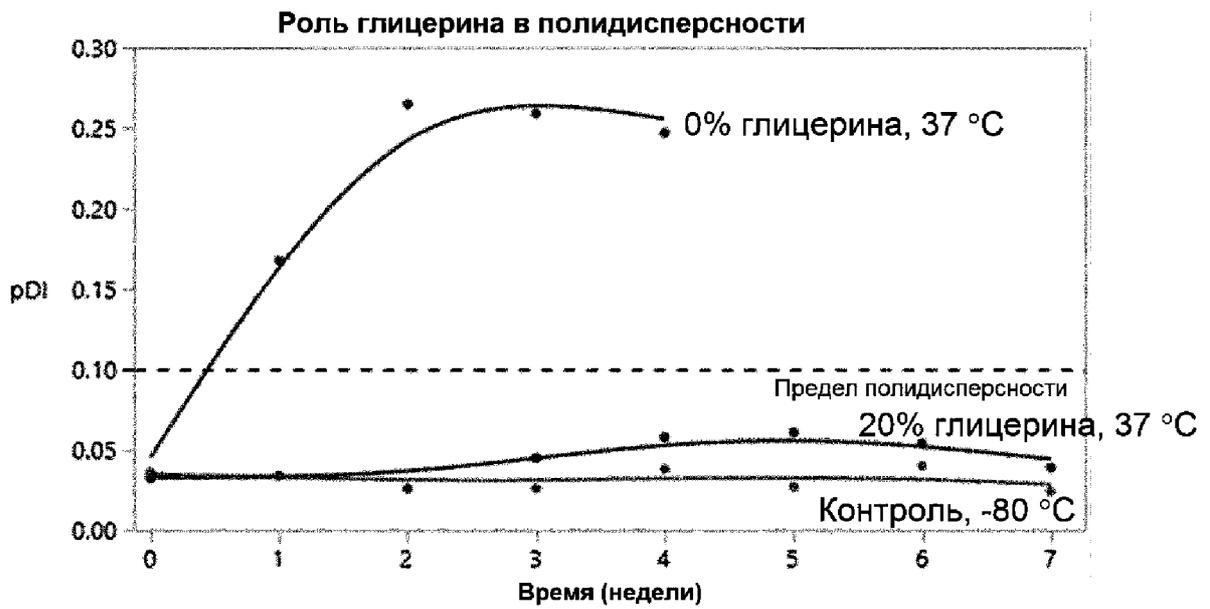
Фиг. 1

Экспериментальная модель (DOE) с ускоренным разложением, демонстрирующая эффективность применения 15-20% глицерина

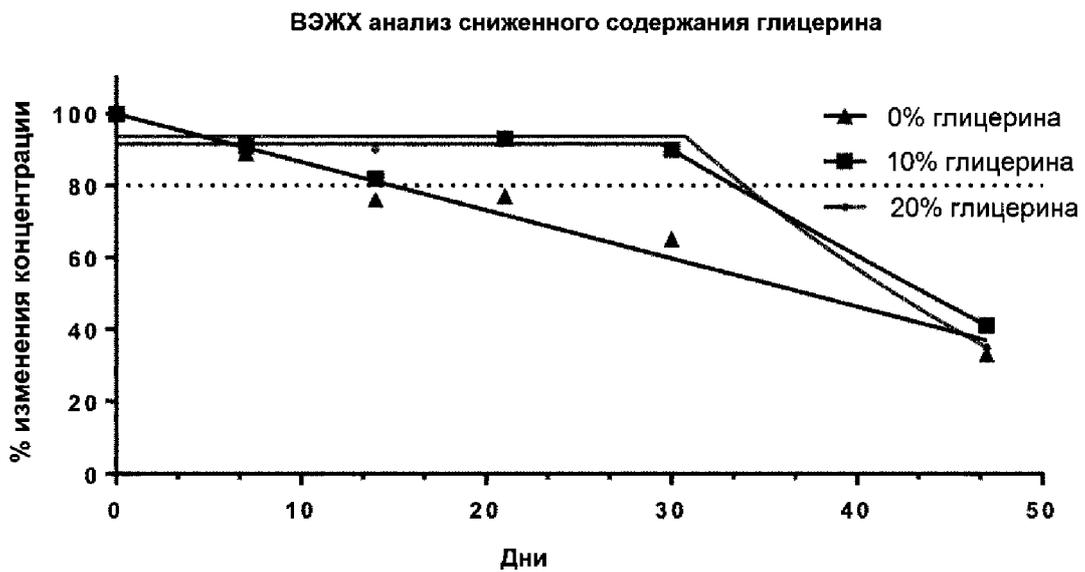


Фиг. 2

В 10 мМ НЕРЕС с глицерином/в условиях ускоренного разложения

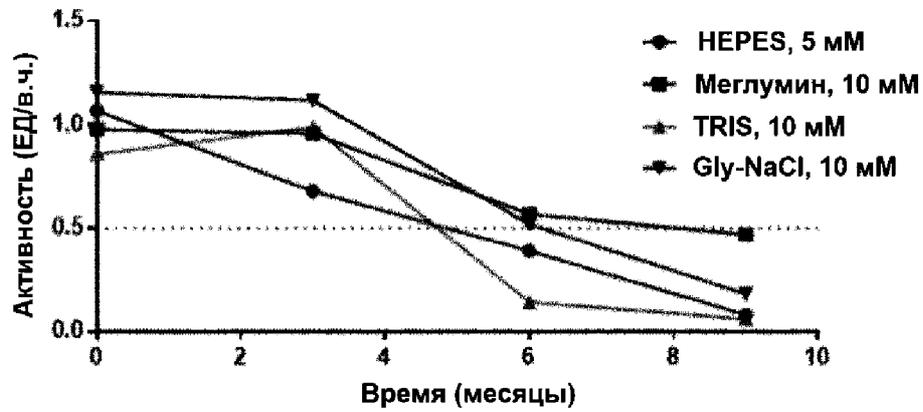


С 10 мМ НЕРЕС с глицерином, хранение при 25 °C

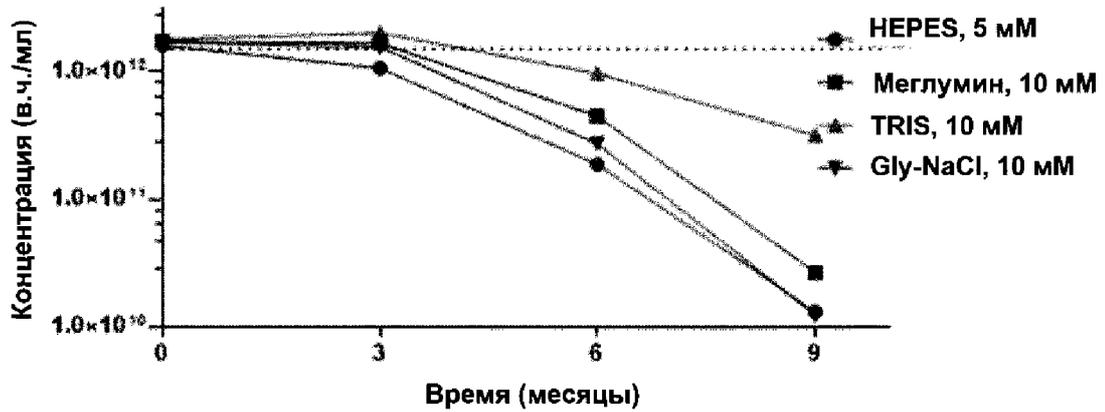


Фиг. 2 (продолжение)

А 20% глицерина и буфер при pH 9 с контролем HEPES и при хранении при 4 °C (без этанола)



В 20% глицерина и буфер при pH 9 с и при 4 °C (без этанола)

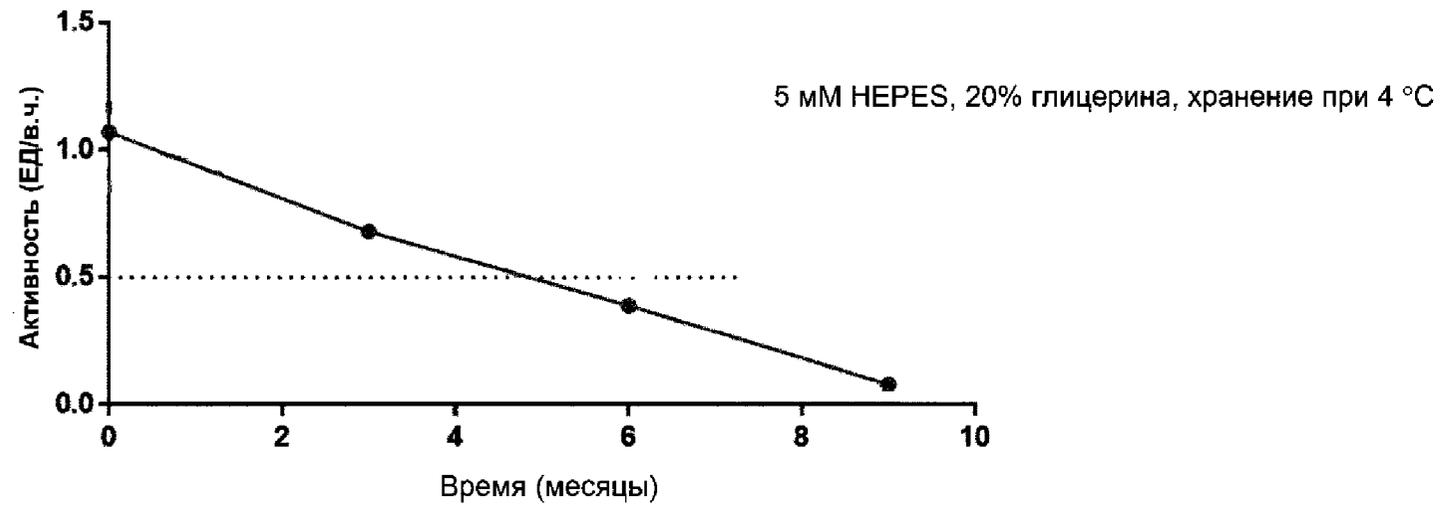


С 20% глицерина, меглумин или Gly-NaCl, этанол, метионин, полисорбат при pH 9 и 4 °C, ВЭЖХ анализ концентрации в.ч./мл

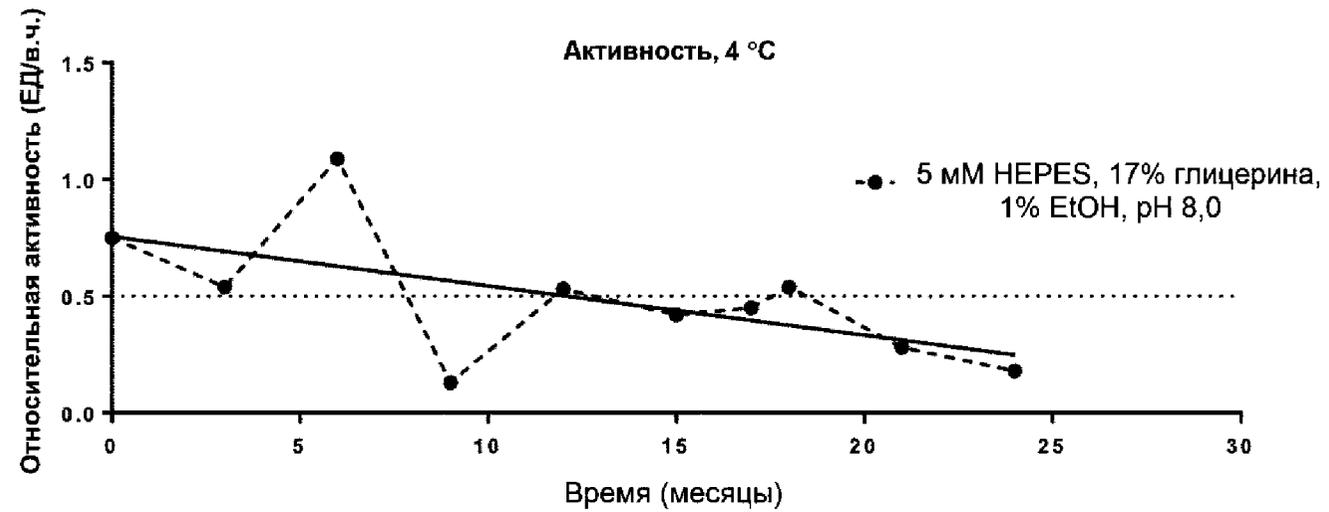


Фиг. 3

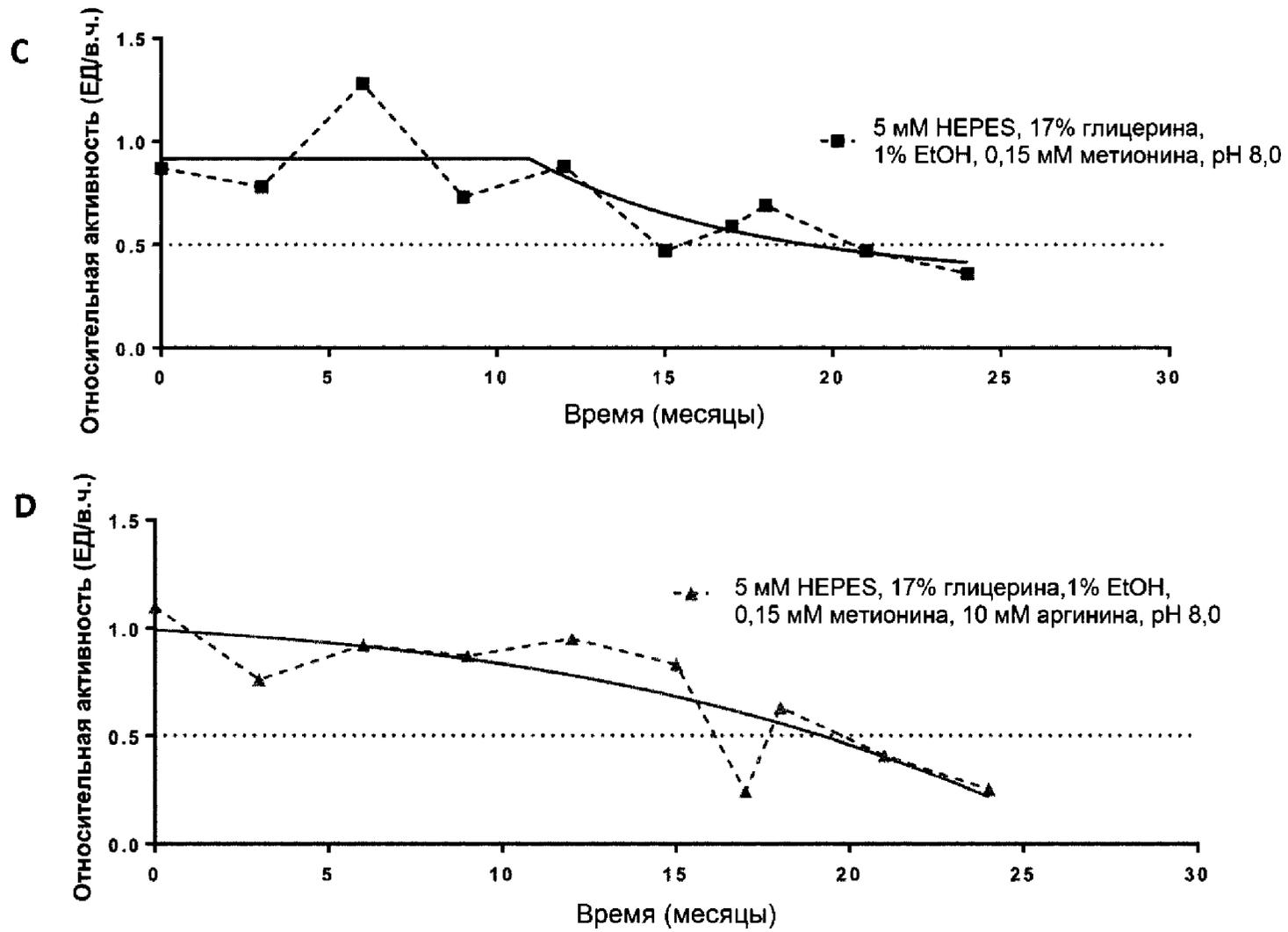
A



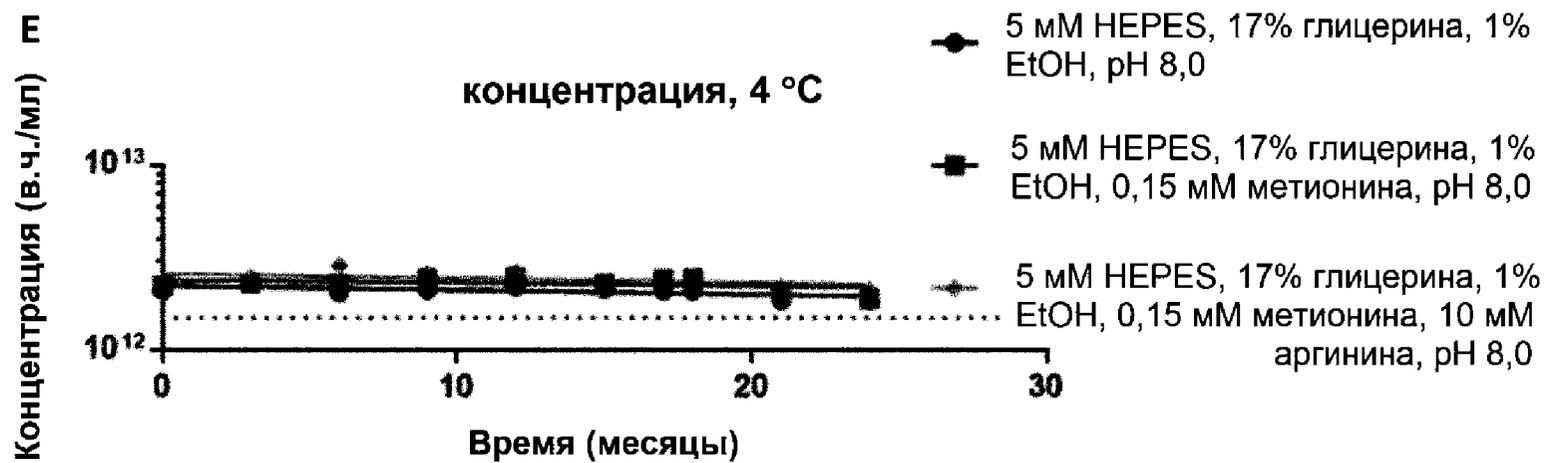
B



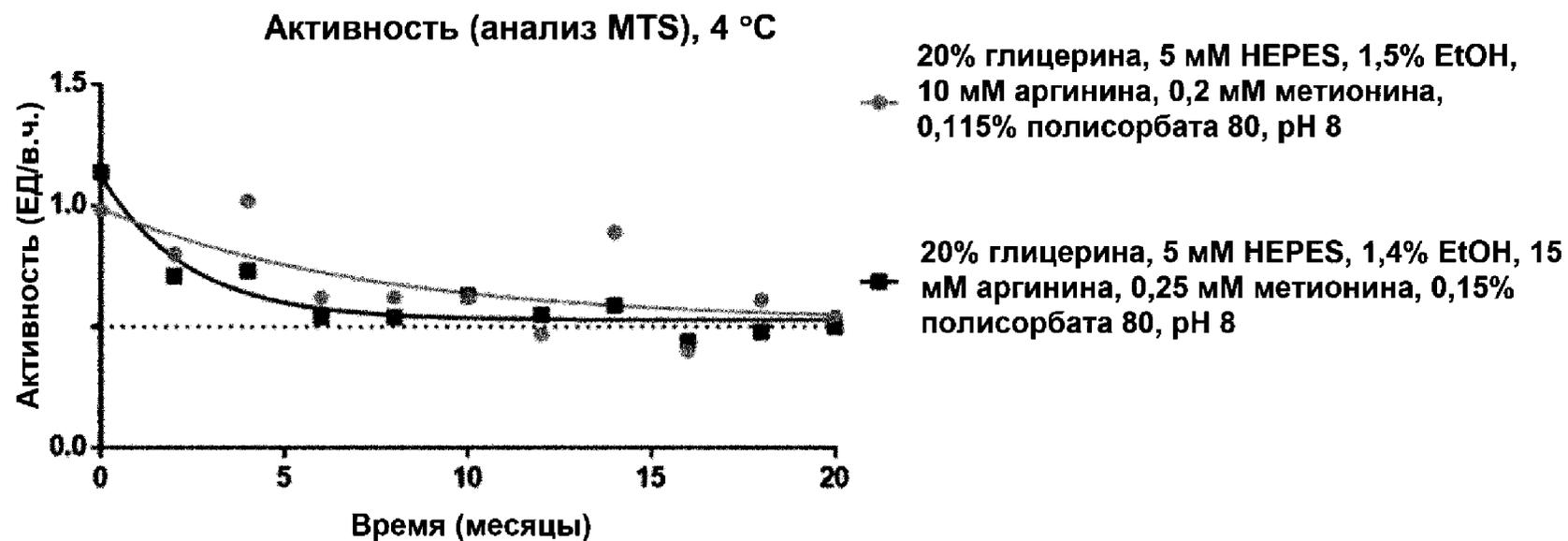
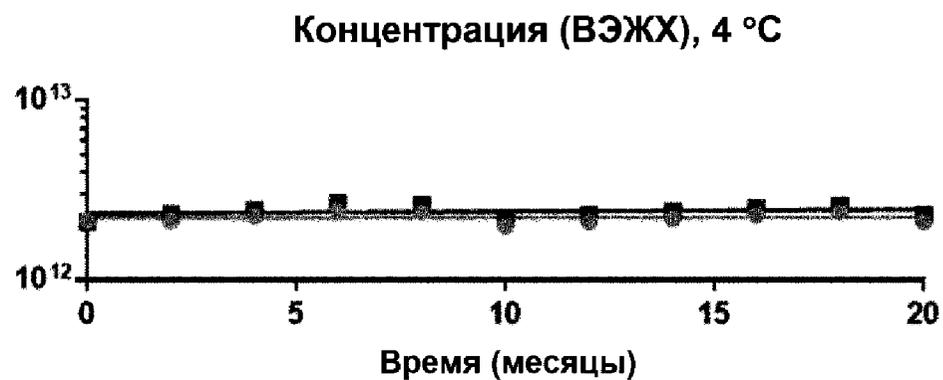
Фиг. 4



Фиг. 4 (продолжение)

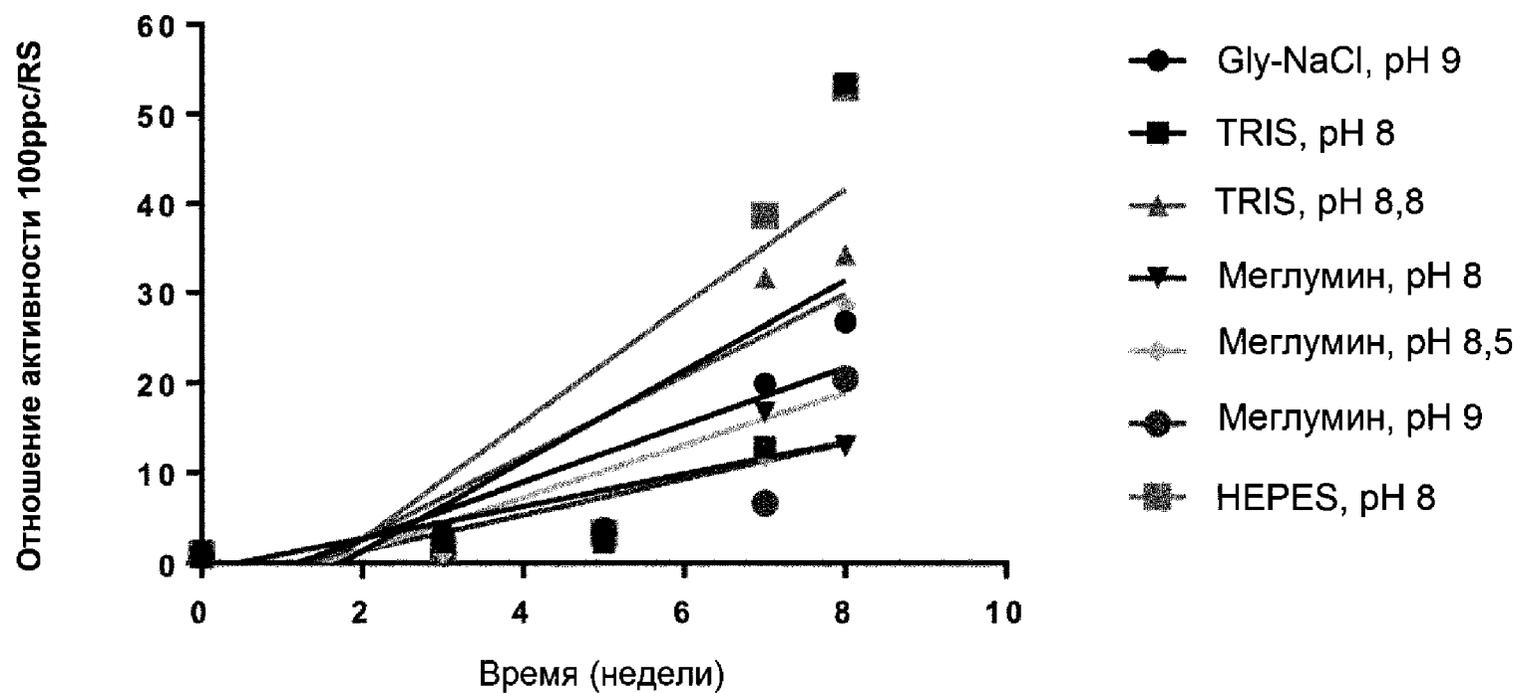


Фиг. 4 (продолжение)

А Плюс полисорбат**В**

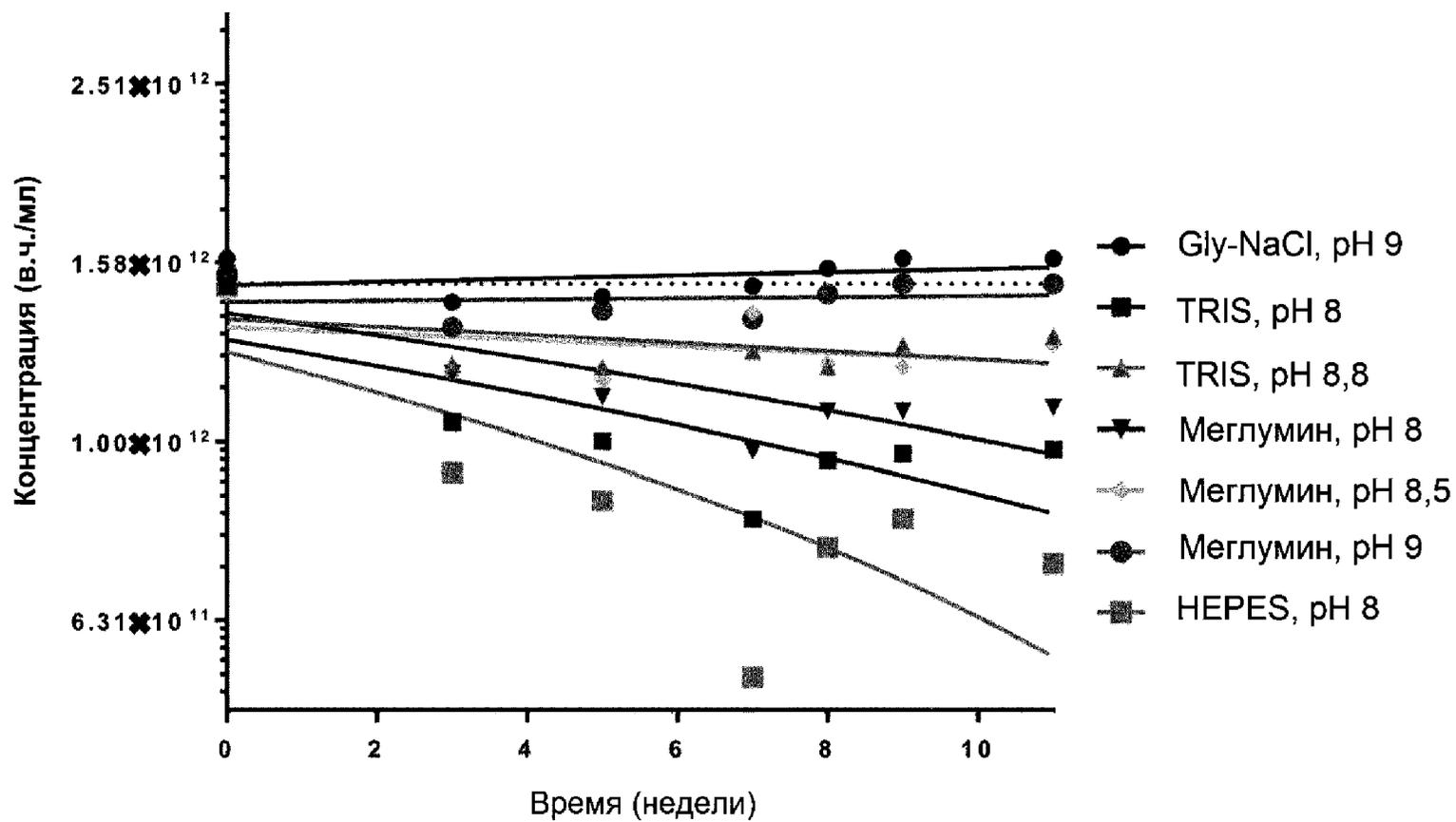
Фиг. 5

Активность (буферный агент, 20% глицерина, 1,4% EtOH, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина, 0,15% полисорбата 80, 25 °С)



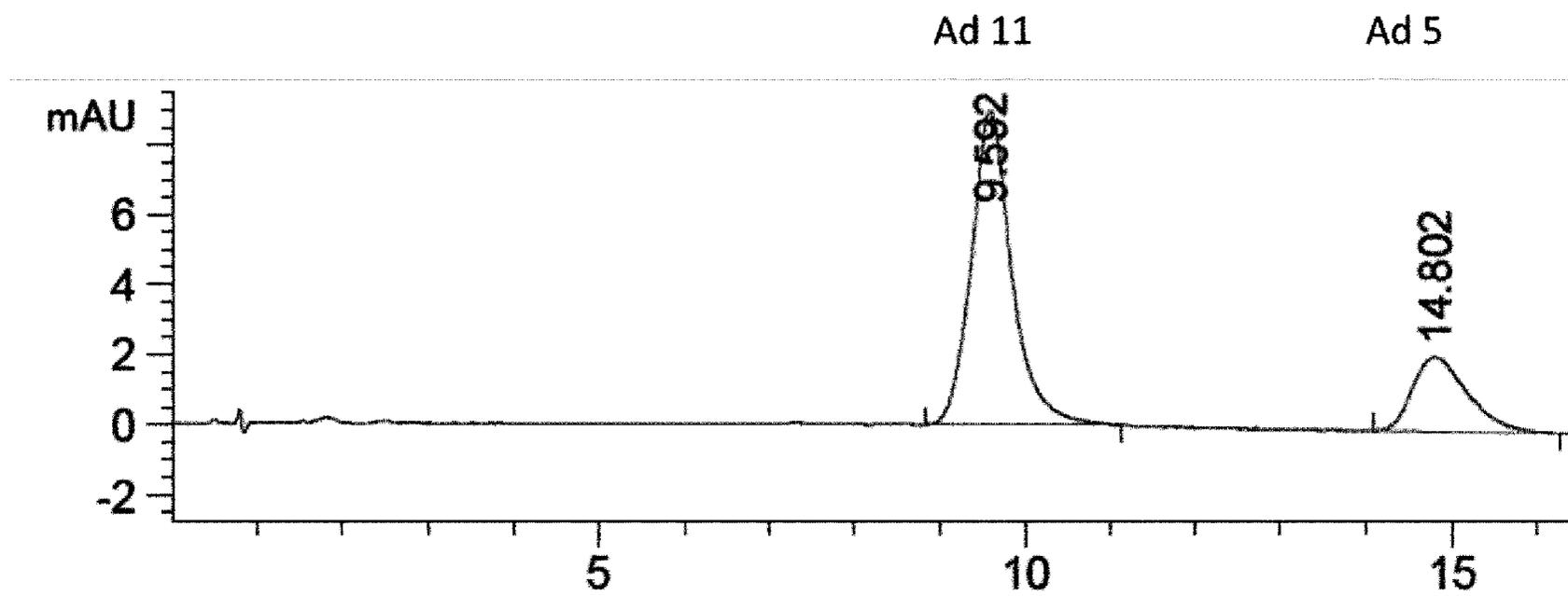
Фиг. 6А

Концентрация (буферный агент, 20% глицерина, 1,4% EtOH, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина, 0,15% полисорбата 80, 25 °С)



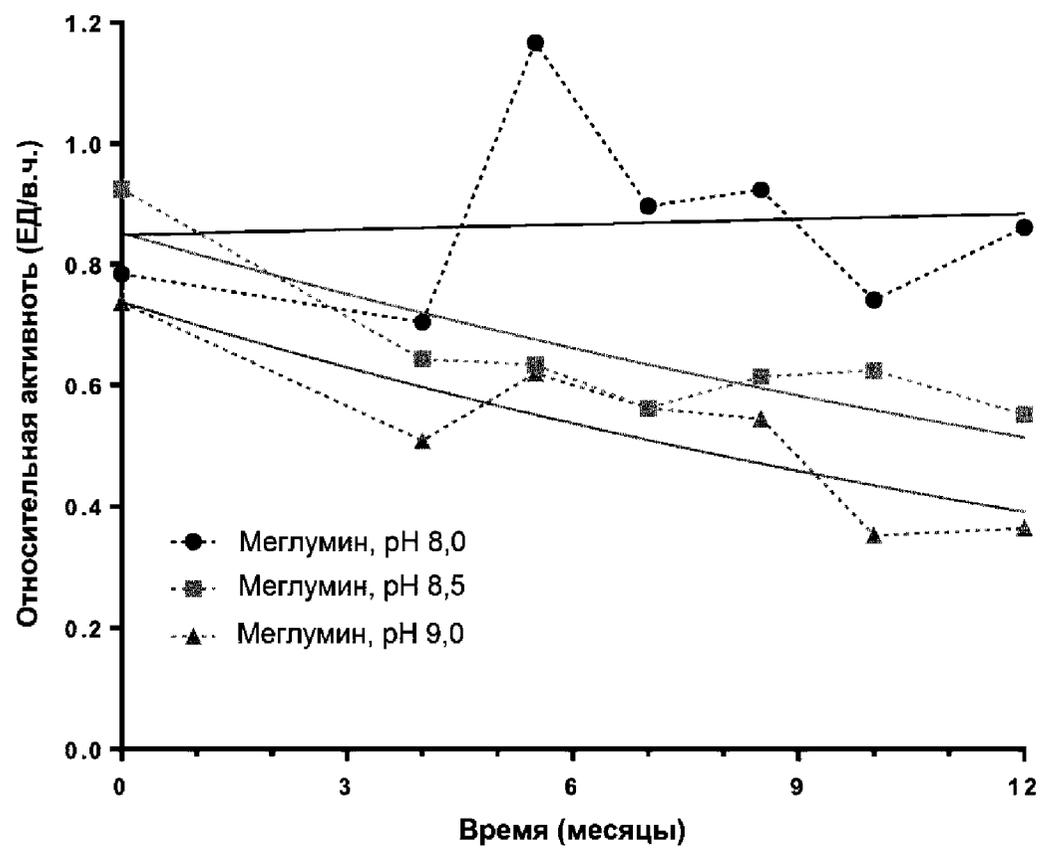
Фиг. 6В

**Аналитическое разделение аденовируса 5 (Ad 5) и аденовируса 11 (Ad 11)
с помощью анионообменной хроматографии**



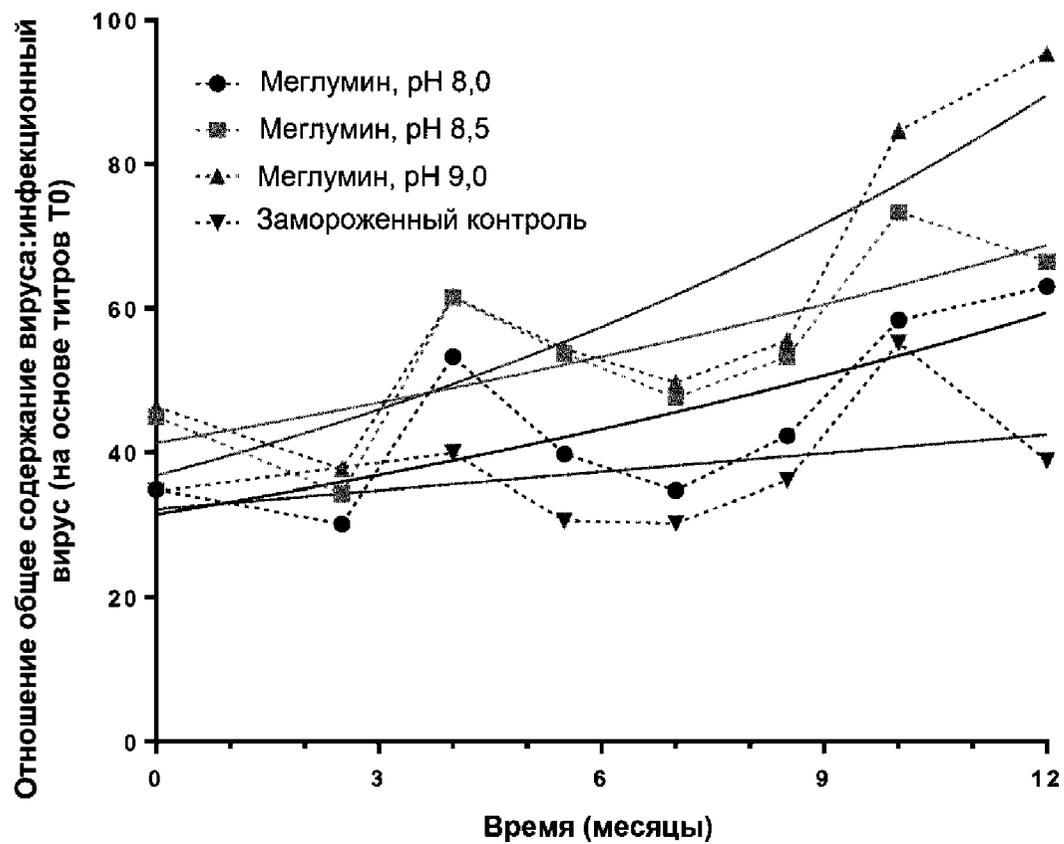
Фиг. 7

Анализ относительной онколитической активности (буферный агент, 20% глицерина, 1,4% этанола, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина), хранение при 4 °С



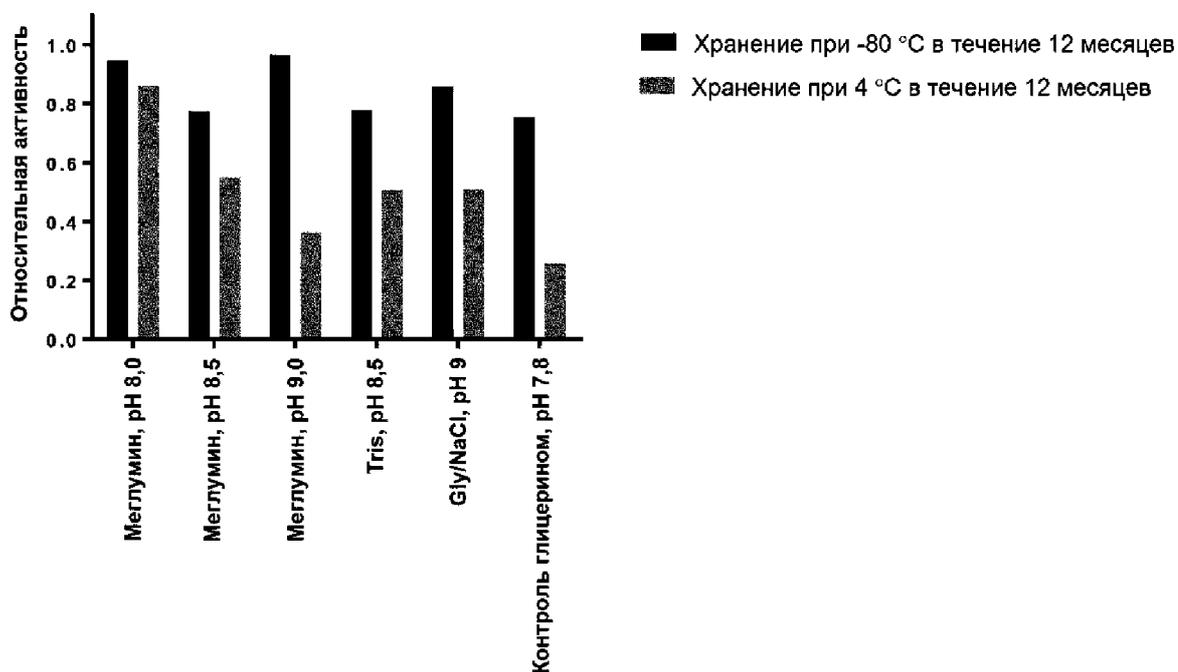
Фиг 8А

Анализ отношения общее содержание вируса:вирусные частицы (буферный агент, 20% глицерина, 1,4% этанола, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина), хранение при 4 °С



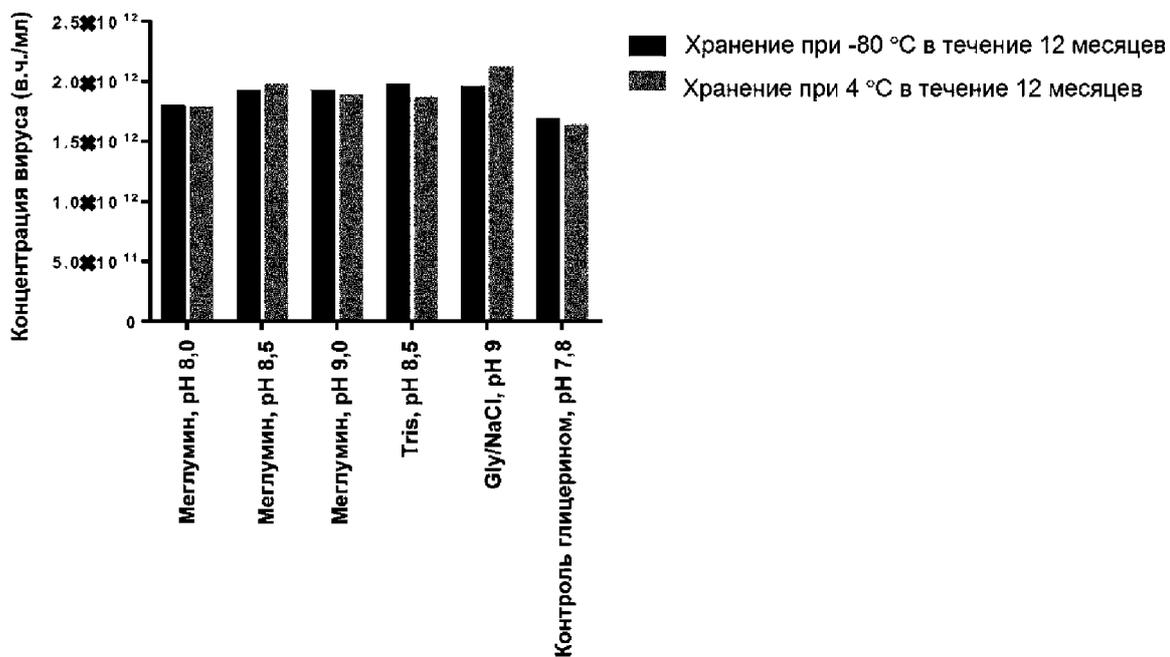
Фиг. 8В

Анализ относительной онколитической активности (буферный агент, 20% глицерина, 1,4% этанола, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина)



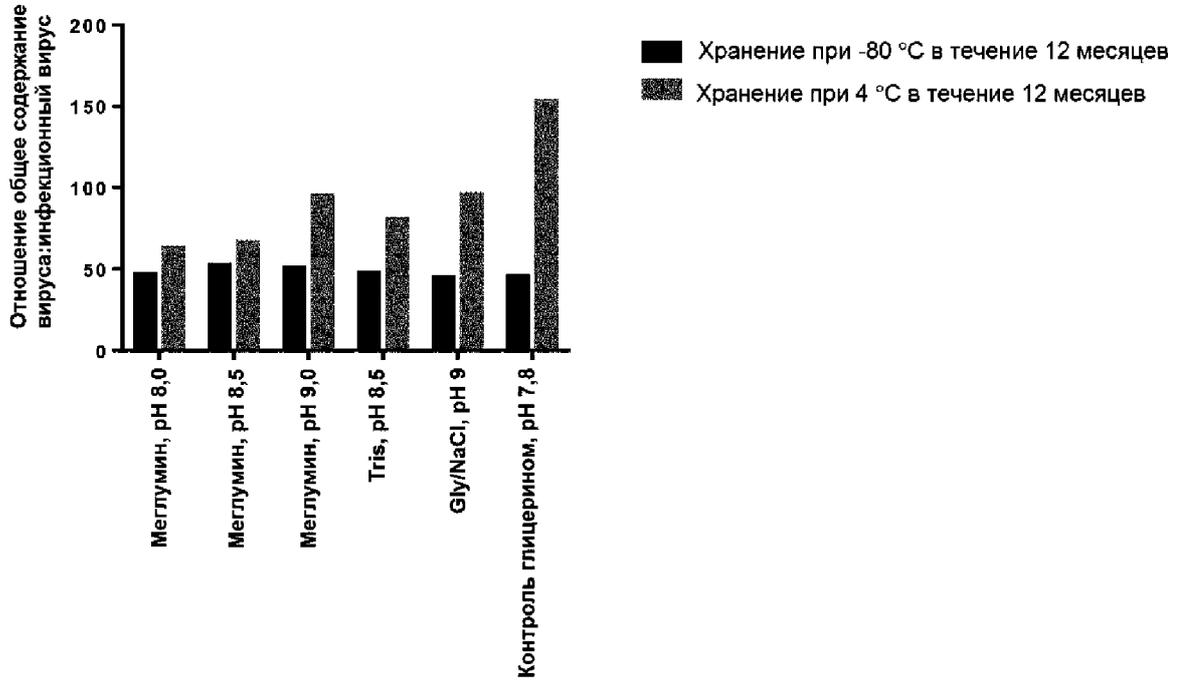
Фиг. 8С

Концентрация вируса с помощью анионообменной ВЭЖХ (буферный агент, 20% глицерина, 1,4% этанола, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина)



Фиг. 8D

Отношение общее содержание вируса:инфекционные вирусные частицы
(буферный агент, 20% глицерина, 1,4% этанола, 15 мМ аргинина, 0,25 мМ метионина)



Фиг. 8Е