

TRADUZIONE DEL TESTO DEL BREVETTO EUROPEO N. 3046536

DAL TITOLO:

“FORMULAZIONI DI ADENOVIRUS MIGLIORATE”

*** **

Descrizione

CAMPO DELL'INVENZIONE

La presente invenzione si riferisce a formulazioni di adenovirus e relativi prodotti farmaceutici per l'utilizzo ad esempio nella terapia genica e/o nelle applicazioni vaccinali. In particolare, sono divulgate nel presente documento formulazioni liquide per adenovirus, che migliorano la stabilità adenovirale conservando quantità, potenza (infettività) e qualità dell'adenovirus contenuto quando conservate in circa l'intervallo di 2-8°C o superiore, pur essendo anche compatibile con la somministrazione parenterale.

STATO DELL'ARTE DELL'INVENZIONE

I vettori adenovirali sono considerati i veicoli più efficaci e ampiamente utilizzati per la veicolazione di geni. Una problematica continua nel campo della terapia genica e della ricerca di vaccini è di generare formulazioni di adenovirus liquide che siano in grado di stabilizzare questi virus per periodi di tempo più lunghi in un intervallo di temperatura di conservazione realistico per i prodotti farmaceutici, come da circa 2°C a circa 8°C.

L'attività biologica di un adenovirus dipende dall'integrità conformazionale di almeno una sequenza di nucleotidi del nucleo

circondata da una struttura del capsido icosaedrica costituita dalle proteine del capsido. A differenza dei farmaci organici e inorganici tradizionali, queste sono strutture biologiche altamente complesse e fattori minori di stress chimico o fisico possono contribuire alla degradazione della particella adenovirale. Una buona formulazione delle preparazioni di adenovirus è pertanto di cruciale importanza per garantire una durata di conservazione ragionevole, ma stabilizzare questi vettori pone problematiche particolari. Agli adenovirus possono perdere potenza a causa di instabilità fisiche, tra cui denaturazione, aggregazione (formazione sia di aggregati solubili che insolubili), precipitazione ed adsorbimento, nonché instabilità chimiche, tra cui idrolisi, deamidazione, ed ossidazione. Ognuna di queste vie di degradazione può portare ad attività biologica ridotta, ma può potenzialmente portare anche alla formazione di sottoprodotti o derivati aventi tossicità aumentata, e/o immunogenicità alterata.

È quindi necessario un approccio personalizzato per trovare una formulazione robusta per gli adenovirus che garantisca stabilità in un'ampia gamma di condizioni. Il tipo di tampone, il pH e gli eccipienti specializzati dovranno essere meticolosamente ottimizzati per mantenere un adenovirus chimicamente, fisicamente e biologicamente stabile. In considerazione di tutti i fattori che possono essere variati, trovare le condizioni ottimali per la formulazione di adenovirus è gravato da problematiche, e la composizione di una buona formulazione è a priori imprevedibile.

Esistono formulazioni liofilizzate e sono stabili. Tuttavia tendono ad essere relativamente costose, richiedono una manipolazione dispendiosa in termini di tempo prima della somministrazione, e la potenza potrebbe in una certa misura essere persa nel processo di liofilizzazione. Esistono formulazioni liquide che sono stabili in condizioni di congelamento (-80°C), ma queste richiedono spedizioni specializzate e costosi impianti di conservazione, rendendo quasi impossibile una catena del freddo affidabile, soprattutto alla periferia della rete di distribuzione. Una formulazione preferita per adenovirus è pertanto una formulazione liquida che offre stabilità adenovirale ad un intervallo di temperatura tra 2-8°C o superiore. Tale formulazione può essere conservata in un normale frigorifero e può essere somministrata rapidamente e facilmente.

Formulazioni liquide per adenovirus sono state descritte in precedenza, per esempio in Evans et al. 2004. Le migliori formulazioni esemplificate in detta domanda sono formulazioni tamponate con Tris aventi un pH compreso tra 7,5 e 8,5. Abbiamo trovato nel presente documento che dette formulazioni sono subottimali per gli adenovirus. Formulazioni per adenovirus sono anche divulgate in WO 00/29024, che si riferisce principalmente alle tecniche di liofilizzazione. Altre formulazioni per adenovirus comprendenti un poliolo sono menzionate in WO 00/29024 US2005085427 si riferisce a composizioni di SYN3, che contengono un vettore adenovirale per l'interferone alfa 2b. Roberts-K-Evans. Journal of Pharmaceutical Sciences, American

Pharmaceutical Association. 93, 10. 01.10.2004. 2458-2475 (XP007914498) si occupa di una stabilità migliorata dell'adenovirus. CN1852918 si riferisce a formulazioni liofilizzate comprendenti un agente che migliora la veicolazione di SYN3 e un adenovirus ricombinante che codifica un gene dell'interferone (ad esempio idrossipropil betaciclodestrina o detergenti).

Di conseguenza, vi è la necessità nell'arte di trovare formulazioni che migliorino la stabilità adenovirale conservando quantità e potenza dell'adenovirus contenuto durante la conservazione per un periodo di tempo prolungato. La stabilità adenovirale dovrebbe essere mantenuta anche nel caso di stress da agitazione durante il trasporto o forze di taglio durante la produzione o utilizzo clinico, e in un'ampia gamma di condizioni climatiche, in particolare a temperature elevate o dopo cicli di congelamento/scongelo ripetuti. Inoltre, la formulazione dovrebbe essere adatta per la via di somministrazione prevista, dovrebbe essere ben tollerata e dovrebbe preferibilmente avere una composizione con il minor numero possibile di componenti. Uno scopo dell'invenzione è quello di fornire tali formulazioni per gli adenovirus.

SOMMARIO DELL'INVENZIONE

Abbiamo trovato e descriviamo nel presente documento, formulazioni per adenovirus che migliorano la stabilità adenovirale conservando quantità e potenza (infettività) e la qualità dell'adenovirus rispetto alle formulazioni precedentemente divulgate.

Sorprendentemente, la combinazione di un tampone citrato avente un pH compreso tra 5,5 e 6,5 insieme ad idrossipropil-beta-ciclodestrina (HBCD) ha portato ad una formulazione eccezionale secondo la rivendicazione 1 per la conservazione di quantità, potenza (infettività) e qualità degli adenovirus, migliorando con ciò la stabilità adenovirale complessiva rispetto ad altre formulazioni note nell'arte.

Come per tutti gli eccipienti utilizzati per lo sviluppo della formulazione, alcuni dei componenti presenti nella formulazione secondo la presente invenzione sono citati separatamente nell'arte antecedente. Tuttavia, è la combinazione molto specifica dei diversi componenti che conferisce alla presente formulazione le sue proprietà eccezionali e il potenziale stabilizzante. La formulazione esatta secondo la rivendicazione 1 non è stata divulgata nell'arte antecedente. Inoltre, non sarebbe stato possibile prevedere, in base all'arte antecedente in questo campo intrinsecamente imprevedibile, che detta formulazione avrebbe fornito una tale stabilità migliorata agli adenovirus.

La presente invenzione pertanto si riferisce a formulazioni di adenovirus stabilizzate e relativi prodotti farmaceutici che possono ad esempio essere utilizzati nella terapia genica e/o nelle applicazioni vaccinali secondo la rivendicazione 1.

Le formulazioni secondo la presente invenzione comprendono un tampone citrato ad un pH compreso tra 5,5 e 6,5, e comprendono inoltre idrossipropil-beta-ciclodestrina (HBCD). Le formulazioni comprendono inoltre un sale e un detergente non ionico.

Eventualmente, le formulazioni secondo la presente invenzione comprendono inoltre un alcol a 2 o 4 atomi di carbonio. Le formulazioni adenovirali della presente invenzione sono soggette a conservazione prolungata da 2°C a 8°C o a $\leq -65^\circ\text{C}$, per più di 6 mesi, 1 anno, 1,5 anni, 2 anni, o più.

Le formulazioni di adenovirus della presente invenzione comprendono a) un adenovirus ricombinante in una b) soluzione tamponata con citrato, che comprende inoltre c) idrossipropil-beta-ciclodestrina (HBCD); d) un sale; e e) un detergente non ionico, in cui detta formulazione ha un pH compreso tra 5,5 e 6,5. Al fine di conservare la stabilità dell'adenovirus è essenziale che il pH di questa formulazione sia compreso tra 5,5 e 6,5.

Preferibilmente la formulazione secondo la presente invenzione comprende l'adenovirus ad un titolo compreso tra circa 1×10^7 vp/ml e 1×10^{13} vp/ml.

In una forma di realizzazione preferita secondo la presente invenzione la concentrazione di citrato nella formulazione varia tra circa 5 mM e 30 mM.

L'idrossipropil-beta-ciclodestrina (HBCD) è il crioprotettore preferito. HBCD è preferibilmente presente in una concentrazione compresa tra circa 1% (p/p) e 10% (p/p).

Il cloruro di sodio (NaCl) è il sale preferito, che è preferibilmente presente ad una concentrazione compresa tra circa 20 mM e 200 mM.

Il Polisorbato-80 è il detergente non ionico preferito che

preferibilmente ha una concentrazione compresa tra circa 0,005% (p/p) e 0,5% (p/p).

In una forma di realizzazione più preferita secondo la presente invenzione la formulazione ha un pH compreso tra circa 5,7 e 6,3, e comprende citrato ad una concentrazione compresa tra circa 5 e 30 mM; HBCD ad una concentrazione compresa tra 1% (p/p) e 10% (p/p); NaCl ad una concentrazione compresa tra 20 mM e 200 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione compresa tra circa 0,01% (p/p) e 0,05% (p/p).

In un'altra forma di realizzazione preferita secondo la presente invenzione la formulazione ha un pH compreso tra circa 5,8 e 6,2, e comprende citrato ad una concentrazione compresa tra circa 15 e 25 mM; HBCD ad una concentrazione compresa tra 3% (p/p) e 8% (p/p); NaCl ad una concentrazione compresa tra 50 mM e 100 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione compresa tra circa 0,01% (p/p) e 0,03% (p/p).

In una forma di realizzazione ancor più preferita la formulazione secondo l'invenzione ha un pH di circa 6 e comprende citrato ad una concentrazione di circa 20 mM; HBCD ad una concentrazione di circa 5% (p/p); NaCl ad una concentrazione di circa 75 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione di circa 0,02% (p/p).

È stato dimostrato nel presente documento che l'aggiunta di un alcool a 2 o 4 atomi di carbonio, in particolare etanolo, nella formulazione della presente invenzione, ha inaspettatamente protetto

fortemente gli adenovirus contro il danno da congelamento/scongelo e di conseguenza ha agito da crioprotettore.

Pertanto, in una forma di realizzazione preferita, la formulazione secondo l'invenzione comprende inoltre un alcol a 2 o 4 atomi di carbonio. In una forma di realizzazione ancor più preferita la formulazione secondo l'invenzione comprende etanolo. La concentrazione di etanolo è compresa preferibilmente tra circa 0,1% (p/p) a 1% (p/p).

In una forma di realizzazione preferita secondo la presente invenzione la formulazione ha un pH compreso tra circa 5,7 e 6,3, e comprende citrato ad una concentrazione compresa tra circa 5 e 30 mM; HBCD ad una concentrazione compresa tra 1% (p/p) e 10% (p/p); NaCl ad una concentrazione compresa tra 20 mM e 200 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione compresa tra circa 0,01% (p/p) e 0,05% (p/p); ed etanolo ad una concentrazione compresa tra circa 0,2% (p/p) e 0,6% (p/p).

In un'altra forma di realizzazione preferita secondo la presente invenzione la formulazione ha un pH compreso tra circa 5,8 e 6,2, e comprende citrato ad una concentrazione compresa tra circa 15 e 25 mM; HBCD ad una concentrazione compresa tra 3% (p/p) e 8% (p/p); NaCl ad una concentrazione compresa tra 50 mM e 100 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione compresa tra circa 0,01% (p/p) e 0,03% (p/p); ed etanolo ad una concentrazione compresa tra circa 0,2%

(p/p) e 0,6% (p/p).

In una forma di realizzazione ancor più preferita la formulazione secondo l'invenzione ha un pH di circa 6 e comprende citrato ad una concentrazione di circa 20 mM; HBCD ad una concentrazione di circa 5% (p/p); NaCl ad una concentrazione di circa 75 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione di circa 0,02% (p/p) ed etanolo ad una concentrazione di circa 0,4% (p/p).

In un'altra forma di realizzazione preferita la formulazione secondo l'invenzione ha un pH di circa 6 e comprende citrato ad una concentrazione di circa 20 mM; HBCD ad una concentrazione di circa 5% (p/p); NaCl ad una concentrazione di circa 80 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione di circa 0,025% (p/p) ed etanolo ad una concentrazione di circa 0,4% (p/p).

In una forma di realizzazione ancor più preferita la formulazione secondo l'invenzione ha un pH di circa 6 e comprende citrato ad una concentrazione di circa 20 mM; HBCD ad una concentrazione di circa 5% (p/p); NaCl ad una concentrazione di circa 80 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione di circa 0,025% (p/p) ed etanolo ad una concentrazione di circa 0,4% (p/p).

In un'altra forma di realizzazione preferita della presente invenzione le formulazioni sono formulazioni liquide (congelate). In ancora un'altra forma di realizzazione, le formulazioni della presente invenzione sono adatte per l'utilizzo parenterale.

In una forma di realizzazione, le formulazioni secondo la

presente invenzione sono contenute in una fiala. In un'altra forma di realizzazione, le formulazioni sono contenute in un sacchetto o una bottiglia. In ancora un'altra forma di realizzazione le formulazioni sono contenute in una siringa o cartuccia.

La presente invenzione si riferisce anche ad un metodo di conservazione di un adenovirus che comprende preparare una formulazione secondo la presente invenzione.

In ancora un'altra forma di realizzazione, la presente invenzione si riferisce ad un metodo di conservazione di un adenovirus che comprende preparare una formulazione come descritta nel presente documento e conservare detta formulazione ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.

La stabilità a lungo termine migliorata in un ampio intervallo di temperature porta ad una durata di conservazione prolungata delle formulazioni del virus divulgate nel presente documento, consentendo la conservazione e l'eventuale somministrazione all'ospite di queste formulazioni preferibilmente in un periodo di circa 1-2 anni, o più con perdite accettabili in potenza virale (ossia non più di 0,31og per due anni a 2-8°C). Inoltre, le formulazioni della presente invenzione mostrano stabilità durante l'esposizione a temperature elevate, cicli di congelamento/scongelamento prolungati ed agitazione.

DESCRIZIONE DELLE FIGURE

Figura 1. Perdita di potenza (Δ) (in log IU/ml) di Ad26 durante temperatura accelerata a 25°C nella Formulazione B (rombi vuoti) e

nella formulazione di controllo (cerchi pieni). È mostrata la Δ potenza media (n=4), che riflette la potenza _{campione sottoposto a stress}-potenza _{campione di controllo}. La potenza è stata misurata mediante QPA.

Figura 2. Perdita di potenza (Δ) (in log IU/ml) di Ad35 durante temperatura accelerata a 25°C nella Formulazione B (rombi vuoti) e nella formulazione di controllo (cerchi pieni). È mostrata la Δ potenza media (n=4), che riflette la potenza _{campione sottoposto a stress}-potenza _{campione di controllo}. La potenza è stata misurata mediante QPA.

Figura 3. Punto di fusione termico di Ad26 nella Formulazione B e nella formulazione di controllo. L'analisi TMA (saggio di fusione termica) (n=3) per Ad26 è stata eseguita su campioni t=0.

Figura 4. Punto di fusione termico di Ad35 nella Formulazione B e nella formulazione di controllo. L'analisi TMA (saggio di fusione termica) (n=3) per Ad35 è stata eseguita su campioni t=0.

Figura 5. Valori Delta Ct (Δ Ct) di Ad26 nella Formulazione B con e senza NaCl, EDTA, etanolo e loro combinazioni dopo 69 giorni a 25°C. I valori Δ Ct si correlano direttamente con una perdita di potenza, dove un numero più elevato significa più perdita di potenza.

Figura 6. Valori Delta Ct (Δ Ct) di Ad26 nella Formulazione B con e senza NaCl, EDTA, etanolo e loro combinazioni dopo 16 giorni a 35°C. I valori Δ Ct si correlano direttamente con una perdita di potenza, dove un numero più elevato significa più perdita di potenza.

Figura 7. Valori Delta Ct (Δ Ct) di Ad26 nella Formulazione B con e senza NaCl, EDTA, etanolo e loro combinazioni dopo 30 cicli di

congelamento/scongelo seguiti da 1 giorno di agitazione. I valori ΔCt si correlano direttamente con una perdita di potenza, dove un numero più elevato significa più perdita di potenza.

Figura 8. Turbidimetria misurata mediante assorbanza a 350 nm di Ad26 nella Formulazione B con e senza NaCl, EDTA, etanolo e loro combinazioni di t=0 (cerchi pieni), 25°C per 69 giorni (rombi vuoti), 35°C per 16 giorni (triangoli pieni) e 30 cicli di congelamento/scongelo seguiti da agitazione (rettangoli vuoti).

Figura 9. Fluorescenza intrinseca di Ad26 nella Formulazione B con e senza NaCl, EDTA, etanolo e loro combinazioni di t=0 (cerchi pieni), 25°C per 69 giorni (rombi vuoti), 35°C per 16 giorni (triangoli pieni) e 30 cicli di congelamento/scongelo seguiti da agitazione (rettangoli vuoti).

Figura 10. Punto di fusione termico di Ad26 nella Formulazione F e nella formulazione di controllo. L'analisi TMA (n=3) per Ad26 è stata eseguita su campioni t=0.

Figura 11. Grafico delle coppie per la probabilità di successo per potenza CQA (limite $\Delta Potenza \geq -0,30 \log IU/ml$) con la condizione di stress Congelamento/scongelo (FT) + agitazione (AG) + conservazione a 35°C. La scala per la probabilità di successo va da 0,4 (grigio chiaro) a 1 (nero). Viene esplorato il dominio sperimentale completo. Nel quadrato bianco vi è lo Spazio di progettazione proposto basato sul grafico.

DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Come menzionato in precedenza, vi è la necessità nell'arte di trovare formulazioni che migliorino la stabilità adenovirale conservando quantità e potenza dell'adenovirus contenuto durante la conservazione per un periodo di tempo prolungato.

Diversi riferimenti divulgano l'utilizzo di componenti specifici per la formulazione di adenovirus. Altaras et al. divulga il citrato come parte di un ampio elenco di possibili inibitori dell'ossidazione di radicali liberi. Detto elenco contiene anche la combinazione di EDTA ed etanolo (EDTA/etanolo), che è identificata come un ulteriore inibitore dell'ossidazione di radicali liberi. La formulazione della presente invenzione utilizza citrato come tampone e non come antiossidante.

Renteria et al. identifica l'idrossipropil-beta-ciclodestrina (HBCD) come uno degli additivi utilizzati per promuovere la stabilità di alcune proteine e per evitare l'aggregazione durante la somministrazione nasale. Renteria et al. divulga l'utilizzo di idrossipropil-beta-ciclodestrina nel contesto di una formulazione appropriata per la somministrazione nasale che migliora l'assorbimento della mucosa. Tutte le proteine sono molto diverse rispetto ai virus vivi come gli adenovirus, in termini di struttura, carica, e dimensione. Di conseguenza, il meccanismo di stabilizzazione per gli adenovirus è completamente diverso e imprevedibile in considerazione del meccanismo di stabilizzazione delle proteine.

WO029024 divulga idrossipropil-beta-ciclodestrina come parte di un ampio elenco di possibili lioprotettori utilizzati per preparare una

formulazione crio essiccata. WO029024 si riferisce ad una composizione crio essiccata rispetto ad una composizione liquida come divulgato nella presente invenzione. Il vantaggio di una formulazione liquida è che è meno costosa, e la manipolazione prima della somministrazione è meno dispendiosa in termini di tempo e meno soggetta ad errori clinici di dosaggio o di ricostituzione. Inoltre, l'incremento su larga scala dei processi di liofilizzazione può essere un'impresa complicata.

Abbiamo trovato e descriviamo nel presente documento, formulazioni per adenovirus che migliorano la stabilità adenovirale conservando quantità e potenza (infettività) e la qualità dell'adenovirus rispetto alle formulazioni precedentemente divulgate.

Le formulazioni dell'invenzione comprendono almeno un adenovirus ricombinante. La costruzione di vettori adenovirali è ben nota nell'arte e comporta l'utilizzo di tecniche biologiche molecolari standard, come quelle descritte, per esempio, in Sambrook et al., *Molecular Cloning, a Laboratory Manual*, 2a ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson et al., *Recombinant DNA*, 2a ed., Scientific American Books (1992), ed Ausubel et al., *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), e altri riferimenti menzionati nel presente documento. In breve, il vettore adenovirale può essere privo di almeno una funzione genica essenziale della regione E1, ad esempio la regione E1a e/o la regione E1b, del genoma adenovirale che è necessario per la

replicazione virale. Come noto al tecnico del ramo per la produzione di adenovirus, in caso di delezioni di regioni essenziali dal genoma dell'adenovirus, le funzioni codificate da queste regioni devono essere fornite in trans, preferibilmente dalla cellula produttrice, per esempio integrate nel genoma, o sotto forma del cosiddetto adenovirus helper o plasmidi helper, quando si produce l'adenovirus ricombinante.

La propagazione di un adenovirus ricombinante è stata descritta in dettaglio in: Brevetto US 6,492,169 o in WO 03/104467 Brevetti U.S. N. 5,559,099, 5,837,511, 5,846,782, 5,851,806, 5,994,106, 5,994,128, 5,965,541, 5,981,225, 6,040,174, 6,020,191, e 6,113,913, e Thomas Shenk, "Adenoviridae and their Replication", M. S. Horwitz, "Adenoviruses", Capitoli 67 e 68, rispettivamente, in Virology, B. N. Fields et al., eds., 3a ed., Raven Press, Ltd., New York (1996), che è incorporato qui a titolo di riferimento. Il vettore adenovirale privo di replicazione può essere generato utilizzando qualsiasi specie, ceppo, sottotipo, o miscela di specie, ceppi, o sottotipi, di un adenovirus o un adenovirus chimerico come fonte di DNA del vettore (vedere ad esempio WO 96/26281, WO 00/03029). In alcune forme di realizzazione della presente invenzione, i sierotipi di adenovirus umano includono uno qualsiasi dei sierotipi 2, 4, 5, 7, 11, 26, 34, 35, 36, 48, 49 o 50 o qualsiasi sierotipo di adenovirus ibrido o mutato. In una forma di realizzazione preferita della presente invenzione l'adenovirus ricombinante proviene dal sierotipo 5, 26 o 35 di adenovirus umano.

In ulteriori forme di realizzazione, l'adenovirus dell'invenzione è

un simian adenovirus, preferibilmente un adenovirus di scimpanzé o gorilla. Questi adenovirus generalmente hanno una bassa sieroprevalenza e/o bassi titoli anticorpali neutralizzanti preesistenti nella popolazione umana.

In ulteriori forme di realizzazione, l'adenovirus dell'invenzione comprende inoltre acido nucleico eterologo. Un acido nucleico eterologo adatto è ben noto al tecnico del ramo, e per esempio può includere cornici di lettura aperte transgeniche, per esempio cornici di lettura aperte codificanti per polipeptidi verso cui è desiderata una risposta immunitaria quando il vettore viene utilizzato ai fini di vaccinazione, ad esempio transgeni adatti a generare una risposta immunitaria verso la malaria (vedere ad esempio WO 2004/055187), HIV, tubercolosi (vedere ad esempio WO 2006/053871), alcuni virus, eccetera, tutti ben noti al tecnico del ramo. In effetti, la natura del transgene non è critica per la presente invenzione, può essere una qualsiasi sequenza di acido nucleico eterologa, e quindi non necessita di ulteriori elaborazioni qui.

Il termine "stabilità" come utilizzato nel presente documento si riferisce alla resistenza relativa alla degradazione delle particelle di adenovirus in una formulazione che mantiene la sua potenza sulla scala temporale della sua utilità prevista. Preferibilmente, la potenza mostra una diminuzione di non più di 0,31og per due anni a 2-8°C.

Il termine "potenza" come utilizzato nel presente documento si riferisce ad una misura dell'attività dell'adenovirus espressa in termini di

unità infettive misurata in un saggio di potenza basato su cellule, che è descritto qui di seguito.

Una composizione secondo l'invenzione mostra una diminuzione della potenza di non più di 0,41og per 60 giorni e una diminuzione del titolo di non più di 0,31og per 60 giorni in uno studio di stabilità accelerata, il quale studio viene eseguito mediante incubazione delle formulazioni a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 1 o 3 mesi.

Una composizione secondo l'invenzione mostra anche una diminuzione della potenza di non più di 0,21og per 10 cicli in uno studio in cui le fiale sono sottoposte a cicli ripetuti di congelamento/scongelo seguiti da 24 ore di agitazione a temperatura ambiente in un orientamento orizzontale a 200 giri/min.

Per "eccipiente farmaceuticamente accettabile" si intende qualsiasi sostanza inerte che è combinata con una molecola attiva come un virus per preparare una forma di dosaggio accettabile o opportuna. L'"eccipiente farmaceuticamente accettabile" è un eccipiente che è non tossico per i destinatari ai dosaggi e alle concentrazioni impiegati, ed è compatibile con altri ingredienti della formulazione comprendente la preparazione virale. Esempi di eccipienti sono crioprotettori, detergenti non ionici, tamponi, sali e inibitori dell'ossidazione di radicali liberi.

Il termine "sottoprodotto" include prodotti indesiderati, che riducono o diminuiscono la proporzione di adenovirus terapeutico/profilattico in una data formulazione. Tipici sottoprodotti

includono aggregati dell'adenovirus e frammenti dell'adenovirus, derivanti ad esempio dalla denaturazione, deamidazione, idrolisi delle proteine, o loro combinazioni. Tipicamente, gli aggregati sono complessi che hanno un peso molecolare maggiore rispetto alla particella virale isolata.

Una formulazione che migliora la stabilità adenovirale, denominata anche "formulazione stabile" come utilizzata nel presente documento è una formulazione in cui l'adenovirus in essa mantiene essenzialmente la sua integrità fisica e/o chimica e/o attività biologica in seguito a conservazione. La stabilità può essere valutata determinando diverse caratteristiche come la quantità (di adenovirus in una formulazione), la potenza, e/o altri aspetti qualitativi dell'adenovirus nella formulazione per un periodo di tempo e in determinate condizioni di conservazione. Queste caratteristiche di una formulazione di adenovirus possono essere misurate a temperature elevate (predittive per temperature in tempo reale) o in altre condizioni di stress, per esempio le formulazioni possono essere sottoposte a incubazione a 25°C o sottoposte a cicli di congelamento/scongelo e agitazione per studiare gli effetti di diverse formulazioni che massimizzano la durata di conservazione. Dette caratteristiche che determinano la stabilità possono essere determinate da almeno uno dei metodi selezionati dal gruppo costituito da ispezione visiva, reazione a catena della polimerasi quantitativa delle particelle virali (vp-QPCR), Saggio di potenza basato su QPCR (QPA), Cromatografia liquida ad alta

prestazione in fase inversa (RP-HPLC) e Sedimentazione centrifuga differenziale (DCS), Saggio di fusione termica (TMA), Turbidimetria, e Fluorescenza intrinseca.

Reazione a catena della polimerasi quantitativa delle particelle virali (vp-QPCR)

La vp-QPCR è stata sviluppata per la quantificazione delle particelle di adenovirus utilizzando primer che sono diretti ad una regione di 100 bp del promotore CMV della cassetta transgenica presente nel vettore adenovirale. In breve, questo metodo QPCR si basa sull'attività esonucleasica della Taq polimerasi, che porta alla degradazione di una sonda fluorescente specifica appaiata nel mezzo dell'amplicone di 100 bp. La sonda è legata covalentemente ad un emettitore di luce e ad un quencher, e la sua degradazione libera l'emettitore dal quencher con una conseguente emissione di fluorescenza proporzionale alla quantità di stampo. I valori quantitativi sono ottenuti dal ciclo soglia (Ct), il ciclo al quale un aumento del segnale di fluorescenza supera un valore soglia. La soglia per la rilevazione della fluorescenza basata sul DNA è impostata leggermente al di sopra del background. Il numero di cicli in cui la fluorescenza supera la soglia è chiamato ciclo soglia (Ct) o, secondo le linee guida MIQE, ciclo di quantificazione (Cq) (Bustin et al, 2009). Durante la fase di amplificazione esponenziale, la sequenza di DNA target raddoppia ogni ciclo. Per esempio, un campione di DNA di cui il Ct precede quello di un altro campione per 3 cicli conteneva $2^3 = 8$ volte più stampo. Di

conseguenza, un valore Ct più elevato rappresenta una quantità inferiore di DNA target e un valore Ct inferiore rappresenta un'elevata disponibilità di DNA target. La quantificazione assoluta può essere eseguita confrontando una curva standard generata da una diluizione seriale di una soluzione madre di adenovirus di cui la concentrazione è stata determinata mediante densità ottica a 260 nm (OD_{260}). I valori Ct del materiale di prova sono tracciati rispetto ai valori Ct della curva standard, che genera un numero accurato e preciso di particelle del vettore.

Quando utilizzati come letture dopo l'incubazione su cellule E1 competenti (QPA, vedere di seguito), i campioni più degradati porteranno a valori delta ($t=0$ sottratti) Ct superiori e formulazioni più stabilizzanti porteranno a valori Ct inferiori.

Saggio di potenza basato su QPCR (QPA)

Per quantificare la potenza dell'adenovirus, il QPA combina QPCR con un saggio di infettività basato su coltura tissutale. Il saggio si basa sull'osservazione sperimentale che la comparsa di DNA virale appena sintetizzato è molto rapida dopo l'inoculazione di un monostrato cellulare, ed è proporzionale alla concentrazione di ingresso del virus in un'ampia gamma di molteplicità di infezione (MOI). Diluizioni dei campioni (diluizioni non all'endpoint) sono inoculate in monostrati cellulari HEK293 in una piastra da 96 pozzetti. L'infezione è lasciata proseguire per 3 ore a 35°C. I pozzetti vengono aspirati e reintegrati con terreno che non contiene adenovirus. Le piastre sono incubate per altre 42 ore

prima della lisi cellulare per mezzo della soluzione Triton X-100 e una singola fase di congelamento/scongelo per rilasciare il DNA dell'adenovirus. Una QPCR viene eseguita sui lisati cellulari diluiti secondo il metodo descritto sopra. Il titolo di infettività viene calcolato in confronto ad una curva standard generata dai valori Ct di un campione di infettività nota, che è determinata mediante titolazione all'endpoint. In alternativa, la delta potenza può essere espressa direttamente come valori Ct dal momento che il titolo di infettività, o potenza, è direttamente correlato ai valori Ct. Soprattutto nel confrontare le differenze relative di potenza tra le formulazioni, questo è un metodo rapido e affidabile.

Cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RP-HPLC)

Al fine di determinare alcuni aspetti qualitativi di un adenovirus, è possibile analizzare i profili proteici adenovirali mediante Cromatografia liquida ad alta prestazione in fase inversa (RP-HPLC). L'HPLC separa i componenti di una miscela utilizzando una varietà di interazioni chimiche tra il campione, la fase mobile (un tampone o solvente) e la fase stazionaria (un materiale di impaccamento cromatografico in una colonna). Una pompa ad alta pressione sposta la fase mobile attraverso la colonna e un rilevatore mostra i tempi di ritenzione (t_R ; tempo tra l'iniezione del campione e la comparsa del massimo di picco) delle molecole utilizzando la rilevazione di assorbanza UV a 280 nm. La separazione di RP-HPLC si basa sulle

differenze di idrofobicità. La fase stazionaria non polare è costituita da catene alchiliche idrofobe (lunghezze delle catene: C4, C8 e C18). La fase mobile polare è acqua con 0,1% di trifluoroacetico (TFA). I composti che si legano alle colonne sono eluiti utilizzando una concentrazione crescente di acetonitrile con 0,1% di TFA. In generale, un analita con un'area superficiale idrofoba più ampia ha un tempo di ritenzione più lungo, mentre la presenza di gruppi polari riduce il tempo di ritenzione. Un tipico profilo RP-HPLC adenovirale è costituito da 10 o 14 proteine, tra cui proteina del nucleo (VII), base del pentone (III) ed esone (II).

Sedimentazione centrifuga differenziale (DCS)

DCS è un metodo per misurare le distribuzioni delle dimensioni delle particelle (aggregazione) mediante sedimentazione. In una centrifuga a disco, le particelle si depositano in un gradiente di saccarosio (di viscosità e densità note) sotto elevate forze gravitazionali secondo la legge di Stokes. La velocità di sedimentazione aumenta con il quadrato del diametro delle particelle, quindi le particelle che differiscono nella dimensione solo di una piccola percentuale si depositano a velocità significativamente diverse. Il tempo necessario per raggiungere il rilevatore viene utilizzato per calcolare la dimensione delle particelle. L'intervallo di misurazione per questo metodo è da circa 0,02 a 30 micron.

Saggio di fusione termica (TMA)

Il saggio di fusione termica (TMA) può essere utilizzato per

determinare la temperatura di fusione (T_m) dell'adenovirus nelle formulazioni sperimentali, che è la temperatura in cui il capsido virale denatura. Questa disintegrazione virale può essere misurata in tempo reale utilizzando un colorante fluorescente intercalante dsDNA. Questo colorante fluorescente fornisce un segnale di fluorescenza solo quando è legato al DNA, che viene rilasciato quando la particella virale si disintegra. L'aumento esponenziale della fluorescenza in seguito a fusione del capsido può essere misurato utilizzando una macchina per QPCR comune durante un aumento graduale della temperatura. I campioni sono diluiti alla stessa concentrazione (l'intervallo è da 4×10^9 a 1×10^{12} vp/ml) nelle formulazioni specifiche e miscelati con il colorante SYBRGreen (concentrazione finale IX) in un volume di 50 μ l. La temperatura è stata aumentata $0,5^\circ\text{C}$ per 30 secondi a partire da 30°C fino a 79°C . Dai dati grezzi fluorescenti vengono calcolate le derivate prima e seconda e la temperatura di fusione viene letta all'intercetta della derivata seconda con l'asse x. Temperature di fusione più elevate (T_m) possono essere indicative di una formulazione più stabilizzante.

Saggio di torbidità

La turbidimetria misura la perdita di intensità della luce trasmessa dovuta alla dispersione delle particelle nei campioni (assorbanza apparente), rilevata ad una lunghezza d'onda in cui le molecole nel campione non assorbono la luce (ad esempio 350 nm per i campioni in cui le proteine sono il cromoforo principale). Quando le molecole si aggregano o formano complessi supramolecolari, la

diffusione della luce, che era casuale quando proveniente dalle particelle separate, diventa ora coerente, e quindi l'intensità misurata aumenta. Questo rende la diffusione della luce e la turbidimetria tecniche utili per rilevare l'aggregazione e la formazione o dissociazione di complessi.

Nel saggio di torbidità, i campioni vengono trasferiti in triplicato ad una micropiastra a fondo piatto trasparente ai raggi UV. La piastra è coperta con un sigillo trasparente ai raggi UV. Gli spettri di assorbanza sono registrati mediante un lettore di micropiastre tra 230 e 500 nm, e l'assorbanza a 975 nm viene misurata per determinare ed eventualmente correggere le differenze nel cammino ottico. I campioni di controllo costituiti dalle formulazioni senza adenovirus sono inclusi nel saggio per correggere la dispersione o l'assorbimento dei componenti della matrice, se necessario. L'assorbanza apparente a 350 nm viene utilizzata come misura quantitativa per la torbidità.

Il saggio di torbidità è indicativo di stabilità per i campioni di adenovirus. L'aggregazione del virus porta ad un aumento della torbidità e la dissociazione del capsido ad una diminuzione. La precisione del saggio è < 5% (CV%) a valori di torbidità > 1 NTU.

La torbidità ottenuta per i campioni sottoposti a stress deve sempre essere confrontata con i campioni di controllo. Dal momento che un aumento o una diminuzione dopo lo stress applicato dipende dalla via di degradazione e specifico per ciascun principio attivo farmaceutico (API), non può essere previsto. Una variazione (superiore

o inferiore) rispetto ai campioni $t=0$ è indicativa di una formulazione meno stabile. Si prevede che i campioni sottoposti a stress comparabili ai campioni $t=0$ siano più stabili.

Saggio di fluorescenza intrinseca

Le proteine del capsido adenovirali contengono amminoacidi aromatici che riemettono luce dopo eccitazione, in particolare triptofano e in misura minore tirosina e fenilalanina. Il massimo di emissione e la resa quantica del triptofano dipendono fortemente dalla polarità del suo ambiente. In un ambiente acquoso polare (ad esempio la superficie di una proteina globulare) la resa quantica è relativamente bassa, mentre in un ambiente apolare (ad esempio l'interno di un aggregato) la resa quantica aumenta. Questa caratteristica rende la fluorescenza del triptofano uno strumento utile per studiare la variazione conformazionale delle proteine, l'aggregazione, e le interazioni molecolari.

Nel saggio di fluorescenza intrinseca, i campioni vengono trasferiti in triplicato ad una micropiastra a fondo piatto trasparente ai raggi UV. La piastra è coperta con un sigillo trasparente ai raggi UV. La fluorescenza del triptofano viene misurata mediante un lettore di micropiastre utilizzando un filtro di eccitazione con una lunghezza d'onda centrale di 280 nm e una larghezza di banda di 10 nm, e un filtro di emissione con una lunghezza d'onda centrale di 340 nm e una larghezza di banda di 10 nm. L'ottica inferiore viene utilizzata per ridurre al minimo l'influenza del sigillo e della forma del menisco.

L'intensità di fluorescenza è nota nell'arte per essere una misura sensibile della stabilità dell'adenovirus. Può essere osservato un aumento o una diminuzione in seguito a stress, a seconda della natura delle variazioni che si verificano nel campione. Si prevede che il dispiegamento della proteina e la dissociazione del capsido portino ad una diminuzione della fluorescenza intrinseca, e si prevede che l'aggregazione porti ad un aumento. La precisione del saggio è < 5% (CV%) nell'intervallo utilizzato.

La fluorescenza ottenuta per i campioni sottoposti a stress deve sempre essere confrontata con i campioni di controllo. Dal momento che un aumento o una diminuzione dopo lo stress applicato dipende dalla via di degradazione e specifico per ciascun principio attivo farmaceutico (API), non può essere previsto. Una variazione (superiore o inferiore) rispetto ai campioni $t=0$ è indicativa di una formulazione meno stabile. I campioni sottoposti a stress che rimangono vicini ai valori del campione $t=0$ sono più stabili.

Un adenovirus "mantiene la sua stabilità fisica" in una formulazione farmaceutica, se, tra l'altro, mostra una perdita minima (ossia $0,3 \log/2$ anni) in termini di quantità e potenza, e non presenta importanti modifiche proteiche. Inoltre, non devono essere osservati segni di aggregazione, precipitazione, variazione di colore e/o trasparenza al momento dell'esame visivo.

"Circa" come utilizzato nella presente domanda significa $\pm 10\%$, se non diversamente indicato.

La presente invenzione si riferisce a formulazioni che stabilizzano un adenovirus e ai relativi prodotti farmaceutici, preferibilmente per l'utilizzo nella terapia genica e/o nelle applicazioni vaccinali. Una formulazione contenente il virus stabilizzato preferita divulgata nel presente documento è una formulazione di adenovirus liquida, che mostra una migliorata stabilità adenovirale quando conservata in circa l'intervallo 2-8°C pur essendo anche compatibile con la somministrazione parenterale. Queste formulazioni possono tuttavia essere anche conservate a temperature inferiori, ad esempio -20°C o inferiori, -40°C o inferiori, -65°C o inferiori, -80°C o inferiori. Possono anche essere più stabili a temperature superiori a 8°C, ad esempio 25°C o anche superiori.

Queste formulazioni che sono in grado di stabilizzare un adenovirus comprendono un tampone citrato, idrossipropil-beta-ciclodestrina (HBCD), un sale e un detergente non ionico, nonché eventuali componenti aggiuntivi che migliorano la stabilità del virus aggiunto. Il pH di detto tampone è compreso tra 5,5 e 6,5.

Le formulazioni della presente invenzione forniscono stabilità agli adenovirus a concentrazioni di virus variabili, mono o multivalente, e possono essere somministrate ad una varietà di organismi vertebrati, preferibilmente mammiferi ed in particolare esseri umani. Le formulazioni virali stabilizzate della presente invenzione sono composizioni a base adenovirale, che possono, per esempio, essere somministrate come un vaccino che può offrire un vantaggio profilattico

ad individui in precedenza non infetti e/o fornire un effetto terapeutico.

Un aspetto preferito dell'invenzione è una formulazione per adenovirus ricombinanti (ossia, un adenovirus contenente un intero o una porzione di un transgene che è espresso all'interno dell'ospite target in seguito alla somministrazione all'ospite, come in qualsiasi metodologia basata sulla terapia genica o vaccinazione genica mammifera/umana disponibile all'esperto) che mostra caratteristiche di stabilità migliorate descritte nel presente documento con una concentrazione del virus nell'intervallo da circa 1×10^7 vp/ml (particelle virali/ml) a circa 1×10^{13} vp/ml. Un intervallo più preferito va da circa 1×10^9 a 1×10^{13} vp/ml, con una concentrazione del virus particolarmente preferita che va da circa 1×10^{10} a 5×10^{12} vp/ml. Composizioni terapeutiche o profilattiche delle formulazioni della presente invenzione possono essere somministrate ad un individuo in quantità sufficienti per trattare o prevenire il rispettivo disturbo. La quantità efficace per la somministrazione umana può, naturalmente, variare in base ad una varietà di fattori come la condizione, il peso, il sesso e l'età dell'individuo. Altri fattori includono la modalità di somministrazione. In una forma di realizzazione preferita, le formulazioni della presente invenzione sono adatte per l'utilizzo parenterale.

Le formulazioni della presente invenzione sono soluzioni tamponate con citrato aventi un pH compreso tra 5,5 e 6,5, comprendono inoltre idrossipropil-beta-ciclodestrina (HBCD) ed eventualmente comprendenti un alcool a due o quattro atomi di

carbonio. Inaspettatamente, detta combinazione ha dimostrato di essere una formulazione eccezionale per la conservazione della quantità, potenza (infettività) e qualità degli adenovirus, come dimostrato nel presente documento.

In una forma di realizzazione preferita, la concentrazione di citrato è compresa tra circa 5 mM e 30 mM, ad esempio tra circa 5 mM e 25 mM, ad esempio tra circa 10 mM e 25 mM, ad esempio circa 20 mM.

Un altro componente essenziale in queste formulazioni che contribuisce alla stabilizzazione del virus in ampi intervalli di temperatura e per periodi di conservazione prolungati è HBCD, che viene utilizzata come crioprotettore. In una forma di realizzazione preferita, la concentrazione di HBCD è compresa tra circa 1% (p/p) a 10% (p/p), ad esempio tra circa 3% (p/p) a 8% (p/p), ad esempio tra circa 4% (p/p) a 6% (p/p), ad esempio circa 5% (p/p).

Un componente aggiuntivo delle formulazioni della presente invenzione è il sale. Il sale migliora la stabilità virale. Uno scopo dell'inclusione di un sale nella formulazione è di raggiungere la forza ionica o l'osmolalità desiderate e inoltre ottimizzare le interazioni elettrostatiche. Il sale è presente ad un'osmolalità che è fisiologicamente accettabile per l'ospite. Contributi alla forza ionica possono provenire dagli ioni prodotti dal composto tamponante nonché dagli ioni dei sali non tamponanti. I sali che sono appropriati per le formulazioni della presente invenzione includono ma non sono limitati a

cloruro di sodio (NaCl), cloruro di calcio (CaCl₂) o cloruro di manganese (MnCl₂). Al contrario dell'arte antecedente, il cloruro di magnesio (MgCl₂) è risultato essere dannoso per la stabilità adenovirale. Pertanto, in una forma di realizzazione preferita, la formulazione secondo la presente invenzione è priva di cloruro di magnesio.

In una forma di realizzazione preferita, la formulazione del virus secondo la presente invenzione comprende cloruro di sodio (NaCl). In una forma di realizzazione preferita, la concentrazione di cloruro di sodio è compresa tra circa 10 mM e 250 mM, ad esempio tra circa 20 mM e 200 mM, ad esempio tra circa 30 mM e 150 mM, ad esempio tra circa 50 mM e 100 mM, ad esempio circa 80 mM.

Le formulazioni della presente invenzione comprendono almeno un detergente non ionico (denominato anche tensioattivo non ionico) aggiunto per ridurre l'adsorbimento alle superfici del contenitore nonché possibilmente fornire un'aumentata stabilizzazione del virus (ad esempio riducendo l'aggregazione). Detergenti non ionici per l'utilizzo nelle formulazioni della presente invenzione includono ma non sono limitati a esteri di acidi grassi di poliossietilene sorbitano, inclusi ma non limitati a Polisorbato-80 (Tween 80®), Polisorbato-60 (Tween 60®), Polisorbato-40 (Tween 40®) e Polisorbato-20 (Tween 20®), e la serie Pluronic di tensioattivi non ionici (ad esempio Pluronic 121).

In una forma di realizzazione preferita, la concentrazione di detergente non ionico è compresa tra circa 0,001% (p/p) e 1% (p/p), ad esempio tra circa 0,005% (p/p) e 0,5% (p/p), ad esempio tra circa 0,01%

(p/p) e 0,1% (p/p), ad esempio tra circa 0,01% (p/p) e 0,05% (p/p), ad esempio tra circa 0,015% (p/p) e 0,03% (p/p), ad esempio circa 0,025% (p/p).

In una forma di realizzazione preferita, la formulazione del virus secondo la presente invenzione comprende Polisorbato-80. La concentrazione di Polisorbato-80 è preferibilmente compresa tra circa 0,001% (p/p) a 1% (p/p), ad esempio tra circa 0,005% (p/p) e 0,5% (p/p), ad esempio tra circa 0,01% (p/p) e 0,1% (p/p), ad esempio tra circa 0,01% (p/p) e 0,05% (p/p), ad esempio tra circa 0,015% (p/p) e 0,03% (p/p), ad esempio circa 0,025% (p/p).

In una forma di realizzazione preferita, la formulazione del virus secondo la presente invenzione comprende inoltre EDTA. In una forma di realizzazione più preferita, la concentrazione di EDTA è compresa tra circa 0,05 mM e 0,2 mM, ad esempio tra circa 0,05 mM e 0,15 mM, ad esempio tra circa 0,08 mM e 0,12 mM, ad esempio circa 0,1 mM.

In un'altra forma di realizzazione preferita, la formulazione del virus secondo la presente invenzione comprende inoltre etanolo. In una forma di realizzazione più preferita, la concentrazione di etanolo è compresa tra circa 0,1% (p/p) a 1% (p/p), ad esempio tra circa 0,2% (p/p) e 0,8% (p/p), ad esempio tra circa 0,2% (p/p) e 0,6% (p/p), ad esempio circa 0,4% (p/p).

In una forma di realizzazione preferita, quando la formulazione del virus secondo la presente invenzione comprende etanolo, non deve necessariamente comprendere EDTA allo stesso tempo.

In considerazione della discussione di cui sopra, la presente invenzione si riferisce ad una formulazione contenente un adenovirus, come un Ad5, Ad26 o Ad35 ricombinante, che può ad esempio essere utilizzato nella terapia genica e/o nelle applicazioni di vaccinazione genica, che mostra proprietà di stabilità migliorate rispetto alla formulazione più performante nota nell'arte (divulgata in Evans et al. 2004) e che contiene almeno un tampone citrato, HBCD come crioprotettore, un sale, e un tensioattivo.

Una particolare forma di realizzazione della presente invenzione si riferisce a tale formulazione di adenovirus ricombinante che è tamponata con citrato ad un pH compreso tra 5,5 e 6,5, e comprende inoltre idrossipropil-beta-ciclodestrina (HBCD), un sale, un detergente non ionico, e un alcol a 2 o 4 atomi di carbonio.

In una forma di realizzazione preferita secondo la presente invenzione, la formulazione comprende un tampone citrato con un pH compreso tra circa pH 5,5 a pH 6,5, comprende HBCD come crioprotettore, NaCl come sale, Polisorbato-80 come tensioattivo e un alcol a 2 o 4 atomi di carbonio come crioprotettore inedito aggiuntivo.

In un'altra forma di realizzazione preferita secondo la presente invenzione, la formulazione comprende un tampone citrato con un pH compreso tra circa pH 5,5 a pH 6,5, comprende HBCD come crioprotettore, NaCl come sale, Polisorbato-80 come tensioattivo ed EDTA.

In un'altra forma di realizzazione preferita secondo la presente

invenzione, la formulazione comprende un tampone citrato con un pH compreso tra circa pH 5,5 a pH 6,5, comprende HBCD come crioprotettore, NaCl come sale, Polisorbato-80 come tensioattivo ed etanolo come crioprotettore inedito aggiuntivo.

In un'altra forma di realizzazione preferita secondo la presente invenzione, la formulazione comprende un tampone citrato con un pH compreso tra circa pH 5,5 a pH 6,5, comprende HBCD come crioprotettore, NaCl come sale, Polisorbato-80 come tensioattivo. Questa formulazione comprende inoltre etanolo ed è priva di EDTA.

In una forma di realizzazione preferita secondo la presente invenzione la formulazione ha un pH compreso tra circa 5,9 e 6,2, e comprende citrato ad una concentrazione compresa tra circa 10 e 25 mM; HBCD ad una concentrazione compresa tra 4% (p/p) e 6% (p/p); NaCl ad una concentrazione compresa tra 70 mM e 100 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione compresa tra circa 0,018% (p/p) e 0,035% (p/p); ed etanolo ad una concentrazione compresa tra circa 0,3% (p/p) e 0,45% (p/p).

In un'altra forma di realizzazione preferita secondo la presente invenzione la formulazione ha un pH compreso tra circa 5,8 e 6,2, e comprende citrato ad una concentrazione compresa tra circa 15 e 25 mM; HBCD ad una concentrazione compresa tra 3% (p/p) e 8% (p/p); NaCl ad una concentrazione compresa tra 50 mM e 100 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione compresa tra circa 0,01% (p/p) e 0,03% (p/p); ed EDTA ad una concentrazione compresa tra circa 0,05

mM e 0,15 mM.

In un'altra forma di realizzazione preferita secondo la presente invenzione la formulazione ha un pH compreso tra circa 5,9 e 6,2, e comprende citrato ad una concentrazione compresa tra circa 10 e 25 mM; HBCD ad una concentrazione compresa tra 4% (p/p) e 6% (p/p); NaCl ad una concentrazione compresa tra 70 mM e 100 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione compresa tra circa 0,018% (p/p) e 0,035% (p/p); ed EDTA ad una concentrazione compresa tra circa 0,05 mM e 0,15 mM.

In una forma di realizzazione ancor più preferita della presente invenzione la formulazione è tamponata con circa 20 mM di citrato ad un pH di circa 6; HBCD è presente ad una concentrazione di circa 5% (p/p); NaCl è presente ad una concentrazione di circa 80 mM; il tensioattivo è Polisorbato-80 ad una concentrazione di circa 0,025% (p/p); ed EDTA è presente ad una concentrazione di circa 0,1 mM.

In una forma di realizzazione ancor più preferita della presente invenzione la formulazione è tamponata con circa 20 mM di citrato ad un pH di circa 6; HBCD è presente ad una concentrazione di circa 5% (p/p); NaCl è presente ad una concentrazione di circa 80 mM; il tensioattivo è Polisorbato-80 ad una concentrazione di circa 0,025% (p/p); ed etanolo è presente ad una concentrazione di circa 0,4% (p/p). Inoltre, possono essere utilizzate combinazioni dei fattori sopra menzionati.

In una forma di realizzazione le formulazioni secondo la

presente invenzione sono contenute in una fiala come ad esempio una fiala di vetro borosilicato di tipo I DIN 2R. In un'altra forma di realizzazione, le formulazioni sono contenute in un sacchetto. I sacchetti che contengono le formulazioni della presente invenzione possono comprendere strati formati ad esempio da copolimero di etilene vinil acetato (EVA) o etil vinil alcol (EVOH). In ancora un'altra forma di realizzazione della presente invenzione, le formulazioni sono contenute in una siringa.

Le formulazioni di virus ricombinante descritte nel presente documento possono essere somministrate all'ospite vertebrato (preferibilmente un ospite mammifero e in particolare un destinatario umano) mediante qualsiasi mezzo noto nell'arte. Queste vie di somministrazione includono ma non sono limitate a iniezione intramuscolare, iniezione intraperitoneale, iniezione endovenosa, inalazione o somministrazione intranasale, somministrazione orale, somministrazione sublinguale, somministrazione sottocutanea, somministrazione transdermica, somministrazione intradermica, somministrazione intraduttale della ghiandola salivare, somministrazione transcutanea o somministrazione percutanea. In una forma di realizzazione preferita, la formulazione della presente invenzione è compatibile con la somministrazione parenterale.

Secondo le formulazioni divulgate nel presente documento, la presente invenzione si riferisce anche a metodi di conservazione di un adenovirus che comprendono preparare formulazioni contenenti virus

come divulgato nel presente documento, tali formulazioni che determinano una stabilità virale migliorata quando conservate al di sotto di -65°C e in circa l'intervallo di 2-8°C e possibilmente superiore pur essendo anche compatibili con la somministrazione parenterale, in particolare la somministrazione parenterale agli esseri umani.

Un altro aspetto della presente invenzione si riferisce pertanto ai metodi di conservazione di un adenovirus che comprendono preparare una formulazione come divulgato nel presente documento e conservare detta formulazione ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.

I seguenti esempi sono forniti per illustrare la presente invenzione senza, tuttavia, limitare la stessa nella presente.

ESEMPI

Esempio 1.

Progettazione sperimentale e metodologia

Dopo aver testato diverse formulazioni diverse, una formulazione ha superato le altre. Questa nuova formulazione è stata denominata "Formulazione B" e comprende 5% (p/p) di HBCD, 20 mM di citrato, 0,02% (p/p) di PS-80 e 75 mM di NaCl ad un pH di 6,0.

Due preparazioni adenovirali (Ad35.TB-S e Ad26.Mos1.Gag-Pol) (una comprendente un adenovirus sierotipo 35 (Ad35) e una comprendente un adenovirus sierotipo 26 (Ad26)) sono state sottoposte a scambio di tampone utilizzando colonne PD-10 (GE Healthcare) nella Formulazione B.

Entrambe le preparazioni adenovirali sono state anche formulate in una "formulazione di controllo" che è stata descritta in Evans et al. 2004 e che era la migliore formulazione disponibile finora. Detta "formulazione di controllo" comprende 10 mM di Tris, 10 mM di Istidina, 1 mM di MgCl₂, 75 mM di NaCl, 5% (p/p) di saccarosio, 0,02% (p/p) di PS-80, 0,1 mM di EDTA, 0,4% (p/p) di EtOH, ad un pH di 7,4.

Per formulazione, sono state utilizzate 12 colonne; gli eluati sono stati riuniti, filtrati sterili e conservati a 2-8°C in una bottiglia di vetro. Sono stati prelevati campioni per la determinazione del titolo virale mediante vp-QPCR e tutti i titoli sono stati regolati con la formulazione tampone appropriata a $1,7 \times 10^{11}$ vp/ml. Successivamente, le formulazioni sono state riempite in fiale di vetro (0,7 ml per fiala), tappate e ricoperte.

I campioni t=0 (controllo, 6 fiale per gruppo) sono stati conservati direttamente a $\leq -65^\circ\text{C}$. Successivamente, sei fiale per gruppo (n=6) sono state incubate a 25°C e congelate a $\leq -65^\circ\text{C}$ a t=10, 20, 30, 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80 e 90 giorni fino a quando l'analisi del campione mediante QPA è stata eseguita in triplicato per campione.

Inoltre, campioni t=0 per i vettori in entrambe le formulazioni sono stati analizzati mediante TMA (saggio di fusione termica) per determinare la temperatura di fusione del capsido. Una temperatura di fusione più elevata è correlata alla maggiore stabilità termica del capsido virale. I campioni all'endpoint (t=90 giorni) sono stati anche analizzati mediante cromatografia liquida ad alta prestazione in fase

inversa (RP-HPLC) e sedimentazione centrifuga differenziale (DCS) e confrontati con i controlli t=0.

Risultati e conclusione

Dopo il completamento dello studio, tutti i campioni sono stati analizzati mediante QPA e la perdita di potenza è stata espressa come delta sottraendo i valori t=0. La formulazione B, secondo la presente invenzione (rombi vuoti) ha superato significativamente ($p=1,44E-05$) la formulazione di controllo (cerchi pieni) portando ad una minore degradazione nel tempo e ad una durata di conservazione prevista più lunga (Tabella 1) per entrambi gli adenovirus (Figura 1 e 2). Con *Statistical Analysis System* (software SAS), i modelli lineari (Ad26) e quadratici (Ad35) sono stati adattati ai dati di potenza utilizzando il tempo e il quadrato del tempo come effetti fissi. Mentre l'effetto "tempo" fisso rappresenta la diminuzione lineare della potenza, l'effetto "tempo*tempo" fisso rappresenta la curvatura di questa diminuzione. Entrambi gli effetti sono stati utilizzati nel modello per valutare la loro significatività. L'Akaike Information Criterion (AIC) è una misura della qualità relativa del modello statistico, tenendo conto della complessità del modello e della sua precisione di adattamento. Più piccolo è AIC, meglio il modello si adatta. Nel modello lineare la pendenza rappresenta il tasso di degradazione della potenza. Confrontando le pendenze, può essere identificato il miglior tampone (pendenza minima).

Le durate di conservazione corrispondono ai punti temporali per

i quali il limite inferiore di questo intervallo passa sotto una data specifica (ossia diminuzione della potenza). Per il modello quadratico, per calcolare la durata di conservazione, sono stati presi gli intervalli di confidenza bilaterali al 95% attorno alla media. Mantenere solo il limite inferiore per la valutazione della durata di conservazione porta ad un livello di confidenza del 97,5% per l'intervallo di confidenza inferiore univariato. Le intercette (che riflettono la potenza a t=0) sono state mediate e rimosse dai dati grezzi e dal modello. Le durate di conservazione sono state calcolate per entrambe le formulazioni.

Tabella 1: Durate di conservazione a 25°C derivate dall'analisi statistica delle curve di degradazione (Figure 1 e 2).

	Formulazione B rispetto al Controllo
Durata di conservazione Ad26	36,1% più lunga
Durata di conservazione Ad35	50,0% più lunga

La RP-HPLC non ha mostrato alcun segno di modificazioni della proteina Adeno né ossidazione. La DCS non ha rivelato alcun segno di aggregazione. Inoltre, la formulazione secondo la presente invenzione ha portato ad una temperatura di fusione significativamente aumentata sia per Ad26 (Figura 3) che per Ad35 (Figura 4) rispetto alla formulazione di controllo, che indica l'aumentata stabilità degli adenovirus nella formulazione B.

Esempio 2

Progettazione sperimentale e metodologia

Dopo gli esperimenti descritti nell'esempio 1, la formulazione B

è stata modificata aggiungendo o omettendo uno o più componenti (NaCl, etanolo, EDTA o loro combinazioni) ottenendo 8 formulazioni sperimentali (da A ad H, vedere Tabella 2) che sono state confrontate con la formulazione di controllo (descritta in Evans et al. e specificata qui sopra). Tutte le formulazioni contengono 5% di HBCD, 20 mM di citrato e 0,02% di PS-80. Come indicato in Tabella 2, le formulazioni comprendono inoltre 75 mM di NaCl, 0,1 mM di EDTA e/o 0,5% di etanolo (EtOH). Gli adenovirus (Ad26) sono stati incubati in queste 9 formulazioni per 69 giorni a 25°C o 16 giorni a 35°C o esposti a 30 cicli di congelamento/scongelo seguiti da agitazione (1 giorno a temperatura ambiente). La perdita di potenza è stata valutata mediante QPA ed espressa come valori delta (t=0 sottratti) Ct (ciclo soglia). Inoltre, l'assorbanza a 350 nm è stata letta come una misura per la torbidità e la fluorescenza intrinseca è stata misurata per rilevare le variazioni conformazionali delle proteine e l'aggregazione. Infine, sono state eseguite una TMA e una vp-QPCR per determinare la temperatura di fusione e il rapporto vp/UI.

Tabella 2: Composizione della formulazione. Tutte le formulazioni contengono 5% di HBCD, 20 mM di citrato e 0,02% di PS-80, alcune integrate con NaCl:75 mM, EDTA: 0,1 mM e/o etanolo (EtOH): 0,5% (p/p).

Formulazione	NaCl	EDTA	EtOH
A	-	-	-

B	+	-	-
C	-	+	-
D	+	+	-
E	-	-	+
F	+	-	+
G	-	+	+
H	+	+	+

Risultati e conclusione

Sulla base dei risultati di stabilità a 25°C mostrati in Figura 5, si può concludere che l'aggiunta di NaCl in combinazione con EDTA (C e D) o etanolo (E ed F) è chiaramente vantaggiosa per la stabilità virale, dove l'etanolo supera chiaramente l'EDTA. Inaspettatamente, la combinazione sia di EDTA che di etanolo con o senza NaCl non porta ad una formulazione più stabile (G e H). Questo è contrario a ciò che ci si sarebbe aspettato dall'arte antecedente, ad esempio Altaras et al, 2005, ed Evans et al. 2004 in cui la combinazione specifica di EDTA/EtOH viene comunemente definita come un inibitore dell'ossidazione di radicali liberi e con ciò un grande miglioratore della stabilità adenovirale.

Passando ad un modello più severo, 35°C per 16 giorni, il potere discriminante diventa più pronunciato, come si può vedere in Figura 6. Chiaramente, l'aggiunta di NaCl migliora la stabilità e l'effetto vantaggioso dell'etanolo è confermato in Figura 6. Sorprendentemente, la combinazione di EDTA insieme ad etanolo, con o senza NaCl, ha un

chiaro effetto negativo sulla stabilità virale. Questo va contro la percezione comune che la combinazione di EDTA/EtOH funzioni bene come inibitore dell'ossidazione di radicali liberi (ad esempio Altaras et al. 2005, ed Evans et al. 2004). Presi insieme, entrambi i fattori di stress termico mostrano l'effetto vantaggioso di NaCl in combinazione con EDTA o etanolo in questa particolare formulazione.

Per studiare le prestazioni delle formulazioni con una via di degradazione diversa, dette formulazioni (da A a H) sono state esposte ad un ciclo di congelamento/scongelo e a stress da agitazione (Figura 7). Gli effetti osservati sono sia pronunciati che inaspettati. Chiaramente, EDTA (C e D) non ha avuto alcun effetto. D'altra parte, l'etanolo ha protetto fortemente contro il danno da congelamento/scongelo e di conseguenza ha agito da crioprotettore (da E ad H).

Questi risultati imprevedibili sono stati confermati dalle letture di assorbanza a 350 nm in un saggio di turbidimetria (Figura 8). Il congelamento/scongelo (quadrati vuoti in Figura 8) ha portato ad una diminuzione della torbidità rispetto a t=0 nelle formulazioni senza etanolo. Questa diminuzione era molto probabilmente dovuta alla disintegrazione delle particelle virali. In linea con queste osservazioni, lo stress da temperatura accelerata (triangoli neri in Figura 8) ha portato anche ad una diminuzione della torbidità nelle formulazioni prive di etanolo, mentre la formulazione con etanolo, in particolare la formulazione F, non presenta alcuna variazione significativa rispetto ai

campioni t=0 (cerchi neri in Figura 8).

Inoltre, la fluorescenza intrinseca (Figura 9) conferma ulteriormente le osservazioni precedenti. La formulazione senza etanolo ha portato ad una sostanziale diminuzione della fluorescenza del triptofano dopo lo stress da congelamento/scongelo rispetto a t=0 (quadrati vuoti in Figura 9) che indica gravi variazioni conformazionali nel capsido virale. In netto contrasto, le formulazioni con etanolo proteggono il virus da questo fattore di stress. Lo stress termico ha avuto solo un impatto minore sulle formulazioni contenenti etanolo.

I dati di TMA hanno rivelato una temperatura di fusione significativamente aumentata della formulazione F rispetto alla formulazione di controllo (Figura 10), che è indicativa di un capsido virale più stabile nella formulazione F.

È importante notare che il rapporto vp/IU, che riflette la proporzione infettiva della preparazione virale (indicativa della qualità delle particelle virali), ha rivelato valori più elevati (meno particelle infettive per quantità totale di particelle) nella formulazione di controllo rispetto alla Formulazione F dopo esposizione a temperatura accelerata (25°C), vedere tabella 3. Questo dimostra che la formulazione F è in grado di conservare l'infettività degli adenovirus in modo molto maggiore rispetto alla formulazione di controllo.

Tabella 3: rapporti vp/IU per la Formulazione F e la formulazione di controllo a t=0 e t=61 a 25°C

	Non sottoposta a stress	Sottoposta a stress
--	-------------------------	---------------------

Formulazione di controllo	39	93
Formulazione F	32	61

Esempio 3.

Progettazione sperimentale e metodologia

Per definire lo spazio di progettazione del tampone di formulazione, è stato valutato l'intervallo di robustezza per ciascun eccipiente. Dopo aver selezionato i fattori, è stato definito un intervallo sperimentale per ciascun componente come riportato in Tabella 4.

È stato seguito l'approccio di Progettazione dell'esperimento (DOE) per mappare lo spazio sperimentale. Utilizzando una progettazione con un livello basso e uno alto per ciascuno dei sei fattori (Tabella 4), sono state preparate 15 formulazioni - inclusi tre punti centrali - per studiare l'effetto di ciascun fattore e le possibili interazioni tra i fattori (Tabella 5) con elevata potenza statistica.

Tabella 4: Fattori e livelli utilizzati per compilare lo spazio sperimentale per lo studio

Fattore di formulazione Tampone F		Livello target Tampone di formulazione F	Livello basso	Livello alto
Composizione del tampone	pH	6,0	5,8	6,2
	Citrato (mM)	20	10	25
	HBCD (p/p)	5	3	6
	EtOH (p/p)	0,4	0,3	0,5

	PS-80 (p/p)	0.02	0,015	0,04
	NaCl (mM)	75	50	100

Tabella 5. Progettazione dell'esperimento. Quindici formulazioni sono state preparate indipendentemente, inclusi tre punti centrali (righe grigie), seguendo i fattori e i livelli utilizzati per compilare lo spazio sperimentale per lo studio.

Nome	pH	Citrato	HBCD	EtOH	PS-80	NaCl	Commenti
F-01	6,2	20	3	0,5	0,04	50	
F-02	5,8	25	3	0,3	0,04	75	
F-00,1	6	20	5	0,4	0,02	75	punto centrale
F-03	6	10	3	0,3	0,015	50	
F-00,2	6	20	5	0,4	0,02	75	punto centrale
F-04	6	25	6	0,5	0,04	100	
F-00,3	6	20	5	0,4	0,02	75	punto centrale
F-05	6,2	25	6	0,3	0,02	50	
F-06	5,8	10	6	0,4	0,04	50	
F-07	6,2	10	6	0,5	0,015	75	
F-08	5,8	10	3	0,5	0,02	100	
F-09	6,2	25	3	0,4	0,015	100	
F-10	5,8	20	6	0,3	0,015	100	
F-11	5,8	25	5	0,5	0,015	50	
F-13	6,2	10	5	0,3	0,04	100	

Per valutare i livelli appropriati per ciascun eccipiente e pH (la

robustezza della formulazione), ciascun gruppo è stato riempito in fiale di vetro e sottoposto a 10 cicli di congelamento/scongelo (F/T), seguiti da 1 giorno di agitazione a 200 giri/min a temperatura ambiente (RT) e conservazione per 7 giorni a 35°C (modello di degradazione accelerata). La potenza mediante QPA (n=3) è stata quindi utilizzata come lettura.

Una preparazione di Ad26 è stata sottoposta a scambio di tampone utilizzando colonne PD-10 (GE Healthcare) in ciascuna delle formulazioni elencate in Tabella 5. Gli eluati di ciascuna formulazione sono stati riuniti, filtrati sterili e conservati a 2-8°C in una bottiglia di vetro. Sono stati prelevati campioni per la determinazione del titolo virale mediante vp-QPCR e tutti i titoli sono stati regolati con la formulazione appropriata a 1×10^{11} vp/ml. Successivamente, le formulazioni sono state riempite in fiale di vetro (0,75 ml per fiala), tappate e ricoperte. I campioni t=0 (controllo, 6 fiale per gruppo) sono stati conservati direttamente a $\leq -65^\circ\text{C}$. Successivamente, quattro fiale per gruppo (n=4) sono state incubate congelate/scongelate, agitate e conservate a 35°C per 7 giorni (Tabella 6) fino a quando l'analisi del campione mediante QPA è stata eseguita in triplicato per campione.

Risultati e conclusione

Dopo il completamento dello studio, tutti i campioni sono stati analizzati mediante QPA e la perdita di potenza è stata espressa come delta sottraendo i valori t=0. Questi dati sono stati utilizzati per l'analisi statistica.

Il risultato dell'analisi statistica era la probabilità di successo, in cui il successo è definito come una formulazione stabile, che soddisfa le specifiche stabilite per l'attributo critico di qualità (CQA) selezionato: potenza. Il test di equivalenza è stato effettuato tra T0 e dopo lo stress: per confrontare l'equivalenza, sono stati definiti i criteri di accettazione sulla perdita massima di potenza (IU/ml) che può essere tollerata: in questo esperimento la perdita di potenza tollerata è stata definita come limite di $\Delta\text{Potenza} \geq -0,30 \log \text{IU/ml}$.

I dati sperimentali ottenuti sono mostrati in Tabella 6 e sono stati utilizzati per ridurre il dominio sperimentale e calcolare uno Spazio di progettazione, basato sulla potenza.

I dati contengono 45 osservazioni. Vi sono 12 tamponi diversi che sono stati testati in triplicato e uno aggiuntivo che è stato preparato tre volte separatamente e ciascuna preparazione indipendente è stata testata in triplicato (punti centrali).

Tabella 6: Valori sperimentali per ciascuna formulazione espressi come $\Delta\text{Potenza}$ (log_IU/ml)

Nome del gruppo	$\Delta\text{Potenza}(\log_{\text{IUperml}})$	Osservazioni
F-01	-0,35	
F-01	-0,29	
F-01	-0,33	
F-02	-0,29	
F-02	-0,29	
F-02	-0,32	

F-00.1	-0,28	PUNTO CENTRALE
F-00.1	-0,27	PUNTO CENTRALE
F-00.1	-0,26	PUNTO CENTRALE
F-03	-0,3	
F-03	-0,33	
F-03	-0,24	
F-00.2	-0,2	PUNTO CENTRALE
F-00.2	-0,28	PUNTO CENTRALE
F-00.2	-0,22	PUNTO CENTRALE
F-04	-0,18	
F-04	-0,26	
F-04	-0,24	
F-00.3	-0,21	PUNTO CENTRALE
F-00.3	-0,18	PUNTO CENTRALE
F-00.3	-0,16	PUNTO CENTRALE
F-05	-0,2	
F-05	-0,18	
F-05	-0,2	
F-06	-0,33	
F-06	-0,25	
F-06	-0,25	
F-07	-0,18	
F-07	-0,27	
F-07	-0,14	

F-08	-0,31	
F-08	-0,28	
F-08	-0,25	
F-09	-0,28	
F-09	-0,26	
F-09	-0,2	
F-10	-0,27	
F-10	-0,26	
F-10	-0,26	
F-11	-0,31	
F-11	-0,27	
F-11	-0,25	
F-13	-0,22	
F-13	-0,15	
F-13	-0,18	

Il seguente modello è stato adattato ai dati:

$\text{delta_log_potenza}[i] \sim \text{normale}(\mu[i], \text{sigma});$

per(i in 1:Nobs){

$\mu[i] <- \text{alfa}_0 +$

$\text{alfa_pH} * \text{pH}[i] +$

$\text{alfa_Citrato} * \text{Citrato}[i] +$

$\text{alfa_HBCD} * \text{HBCD}[i] +$

$\text{alfa_EtOH} * \text{EtOH}[i] +$

$\text{alfa_PS_80} * \text{PS_80}[i] +$

$$\begin{aligned}
& \text{alfa_NaCl} * \text{NaCl}[i] + \\
& \text{alfa_HBCD2} * \text{HBCD}[i] * \text{HBCD}[i] + \\
& \text{alfa_PS_802} * \text{PS_80}[i] * \text{PS_80}[i] + \\
& \text{alfa_pH_HBCD} * \text{pH}[i] * \text{HBCD}[i] + \\
& \text{alfa_pH_NaCl} * \text{pH}[i] * \text{NaCl}[i] + \\
& \text{alfa_r_Lotto}[\text{lotto}[i]];
\end{aligned}$$

dove alfa-r-lotto rappresenta il lotto casuale e sigma l'errore residuo.

Per ottenere previsioni dal modello per ottenere un approccio di Spazio di progettazione basato sul rischio, è stato adottato il framework Bayesiano poiché la distribuzione congiunta predittiva del CQA dati i parametri di formulazione può essere facilmente derivata (vedere Peterson et al. e Lebrun et al.). Lo Spazio di progettazione basato sul rischio è definito utilizzando la seguente affermazione di probabilità:

$$\text{Design Space} = \{\tilde{x} \in \chi \mid P(\text{CQAs} \in \Lambda \mid X = \tilde{x}, \text{data}) \geq \pi\} \quad (1)$$

“Design Space” = Spazio di progettazione

“data” = dati

In altre parole, lo Spazio di progettazione è una regione del dominio sperimentale χ (spesso chiamato spazio di conoscenza) in cui la probabilità a posteriori che i CQA rientrino nelle specifiche (Λ), è superiore rispetto ad un livello di qualità specificato π , dati i dati osservati. Questa notazione rende implicita l'inclusione dell'incertezza inclusa nel modello statistico. La probabilità è una misura diretta delle garanzie per soddisfare le specifiche congiuntamente. Per calcolare

questa probabilità, i modelli statistici possono essere scritti come la seguente equazione lineare generica. Per il j^{th} CQA, un modello è regolato:

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

dove y_i è qualsiasi trasformazione applicata al i^{th} CQA al fine di ottenere buone proprietà statistiche (ad esempio identità, log o trasformazioni logit), $i = 1, \dots, 7$. I parametri del modello b_j e σ_i^2 devono essere stimati (vedere gli articoli di cui sopra).

La probabilità a posteriori dell'Equazione (1) è calcolata dalla distribuzione predittiva di nuove risposte, identificata come la seguente distribuzione di Student (gli indici i sono rimossi per semplicità):

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

"data" = dati

Questa distribuzione di Student a tre parametri ha $n - p$ gradi di libertà (per n osservazioni e p parametri del modello), è centrata sulla linea di regressione media $\tilde{x}\hat{\beta}$, calcolata dalla stima dei minimi quadrati ordinaria di β : $\hat{\beta} = (X'X)^{-1}X'y$.

$S = a.(1 + \tilde{x}'(X'X)^{-1}\tilde{x})$, dove il parametro a è la somma residua del quadrato, cioè $a = (y - X\hat{\beta})'(y - X\hat{\beta})$. Quindi, S definisce la scala della distribuzione di Student. Lo stimatore della varianza è calcolato come $S/(n - p)$.

Per esplorare il dominio sperimentale, non è consigliabile creare una griglia su 5 fattori (a causa di un problema di dimensionalità: se sono stati valutati 2 livelli per fattore, si otterrebbe una griglia da 25,

se 10 livelli per fattori, porterebbe ad una griglia da 105, eccetera). Invece, un certo numero di campioni casuali sono stati creati ed esplorati come segue:

a) Scegliere un numero elevato casuale (uniformemente distribuito su χ) di condizioni operative (impostazioni dei fattori) \hat{x}_i all'interno del dominio sperimentale

b) Per ciascuna condizione operativa: eseguire un numero elevato di simulazioni: Disegnare n^* campioni $\tilde{y}_{ij} | \hat{x}_j$, dati ($i = 1, \dots, n^*$) dalle distribuzioni predittive come nell'Equazione (3), per ciascun CQA

c) Dalle diverse simulazioni della previsione di CQA, calcolare la proporzione di campioni all'interno delle specifiche

Questa proporzione è la stima di probabilità a posteriori per ottenere i risultati di qualità dati gli Attributi critici di qualità e le loro specifiche. Infine, si propone di valutare visivamente la distribuzione operativa casuale sui grafici delle coppie della proiezione dei risultati in spazi bidimensionali, per identificare uno Spazio di progettazione (Figura 11).

I calcoli sono stati poi adattati e gli intervalli di fattori sono stati ridotti per massimizzare la probabilità di successo per la potenza CQA in questi intervalli (Tabella 7), che riflettono i cosiddetti Intervalli operativi normali (NOR) e lo Spazio di progettazione. Gli intervalli mostrati in Tabella 7 garantiscono la più elevata probabilità di successo di avere una formulazione stabile. Questi intervalli garantiscono quindi una stabilità ottimale del prodotto.

Tabella 7. Spazio di progettazione con intervalli di fattori selezionati (NOR)

Fattore di formulazione	<i>Specifica</i>
pH	<i>5,9-6,2</i>
Citrato (mM)	<i>10-25</i>
HBCD (p/p)	<i>4-6</i>
EtOH (p/p)	<i>0,3-0,45</i>
PS-80 (p/p)	<i>0,018-0,035</i>
NaCl (mM)	<i>70-100</i>

Riferimenti

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

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

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

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

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

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

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

Renteria S S et al. "Development of a nasal adenovirus-based vaccine: Effect of concentration and formulation on adenovirus stability and infectious titer during actuation from two delivery devices" Vaccine, vol. 28, n.9, 25 Febbraio 2010.

RIVENDICAZIONI

1. Formulazione liquida per adenovirus comprendente:
 - a) un adenovirus ricombinante;
 - b) un tampone citrato;
 - c) idrossipropil-beta-ciclodestrina (HBCD);
 - d) un sale;
 - e) un detergente non ionico;in cui detta formulazione ha un pH compreso tra 5,5 e 6,5.
2. Formulazione secondo la rivendicazione 1, in cui la concentrazione di citrato è compresa tra 5 mM e 30 mM.
3. Formulazione secondo la rivendicazione 1 o 2, in cui la concentrazione di HBCD è compresa tra 1% (p/p) a 10% (p/p).
4. Formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-3, in cui il sale è cloruro di sodio.
5. Formulazione secondo la rivendicazione 4, in cui la concentrazione di cloruro di sodio è compresa tra 20 mM a circa 200 mM.
6. Formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-5, in cui il detergente non ionico è Polisorbato-80.
7. Formulazione secondo la rivendicazione 6, in cui la concentrazione di Polisorbato-80 è compresa tra 0,005% (p/p) e 0,5% (p/p).
8. Formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-7, in cui detta formulazione ha un pH compreso tra 5,7 e 6,3, e

comprende citrato ad una concentrazione compresa tra 5 e 30 mM; HBCD ad una concentrazione compresa tra 1% (p/p) e 10% (p/p); NaCl ad una concentrazione compresa tra 20 mM e 200 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione compresa tra 0,01% (p/p) e 0,05% (p/p).

9. Formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-8, in cui la formulazione comprende inoltre un alcol a 2 o 4 atomi di carbonio.

10. Formulazione secondo la rivendicazione 9, in cui l'alcol a 2 o 4 atomi di carbonio è etanolo.

11. Formulazione secondo la rivendicazione 10, in cui la concentrazione di etanolo è compresa tra 0,1% (p/p) e 1% (p/p).

12. Formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 9-11, in cui detta formulazione ha un pH compreso tra 5,7 e 6,3, e comprende citrato ad una concentrazione compresa tra 5 e 30 mM; HBCD ad una concentrazione compresa tra 1% (p/p) e 10% (p/p); NaCl ad una concentrazione compresa tra 20 mM e 200 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione compresa tra 0,01% (p/p) e 0,05% (p/p); ed etanolo a una concentrazione compresa tra 0,2% (p/p) e 0,6% (p/p).

13. Formulazione secondo la rivendicazione 12, in cui detta formulazione ha un pH di 6 e comprende citrato ad una concentrazione di 20 mM; HBCD ad una concentrazione di 5% (p/p); NaCl ad una concentrazione di 80 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione di 0,025% (p/p) ed etanolo ad una concentrazione di 0,4% (p/p).

14. Formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni

10-12, in cui detta formulazione ha un pH compreso tra 5,9 e 6,2, e comprende citrato ad una concentrazione compresa tra 10 e 25 mM; HBCD ad una concentrazione compresa tra 4% (p/p) e 6% (p/p); NaCl ad una concentrazione compresa tra 70 mM e 100 mM; Polisorbato-80 ad una concentrazione compresa tra 0,018% (p/p) e 0,035% (p/p); ed etanolo a una concentrazione compresa tra 0,3% (p/p) e 0,45% (p/p).

15. Formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-14, in cui detta formulazione è adatta per l'utilizzo parenterale.

16. Metodo di conservazione di un adenovirus che comprende preparare una formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-15.

17. Metodo di conservazione di un adenovirus che comprende preparare una formulazione secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1-15 e conservare detta formulazione ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C.

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

LEGENDA DELLE TAVOLE DEI DISEGNI

TAVOLE 1-2/11

Figura 1-2

“Time at 25 °C (days)” = Tempo a 25°C (giorni)

“ Δ potency (log IU/mL)” = Δ potenza (log IU/ml)

“Formulation B” = Formulazione B

“Control formulation” = Formulazione di controllo

TAVOLE 3-4/11

Figura 3-4

“Formulation B” = Formulazione B

“Control formulation” = Formulazione di controllo

TAVOLE 5-6/11

Figura 5-6

“days” = giorni

“Supplement” = Integrazione

“none” = nessuna

TAVOLA 7/11

Figura 7

“F/T+agitation” = F/T+agitazione

“Supplement” = Integrazione

“none” = nessuna

TAVOLA 8/11

Figura 8

“Absorbance at 350 nm” = Assorbanza a 350 nm

“Supplement” = Integrazione

“none” = nessuna

“EDTA and EtOH” = EDTA e EtOH

TAVOLA 9/11

Figura 9

“Trp fluorescence intensity” = Intensità di fluorescenza del Trp

“Supplement” = Integrazione

“none” = nessuna

“EDTA and EtOH” = EDTA e EtOH

TAVOLA 10/11

Figura 10

“Formulation B” = Formulazione B

“Control formulation” = Formulazione di controllo

TAVOLA 11/11

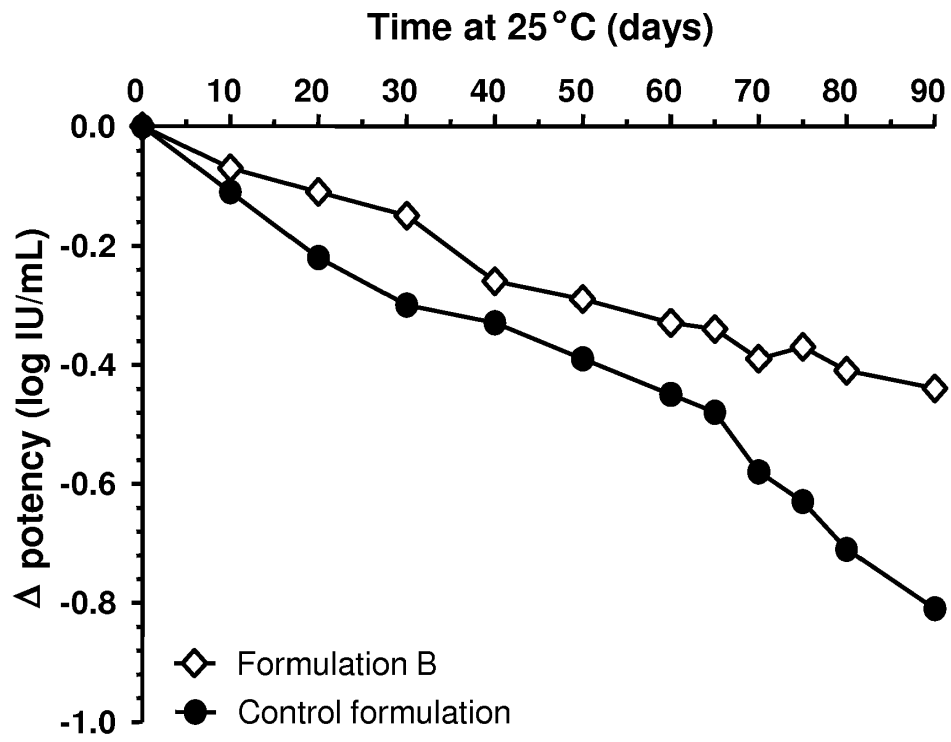
Figura 11

“probability of success” = probabilità di successo

“Citrate” = Citrato

*** **

Si attesta la perfetta conformità della traduzione che precede.

**Fig. 1**

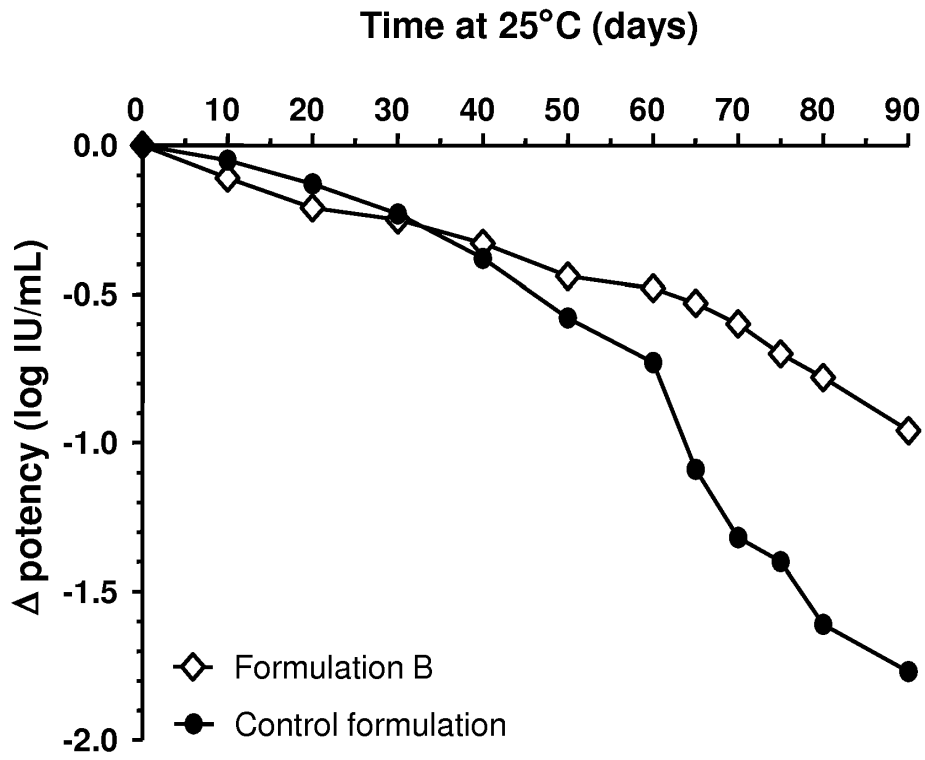


Fig. 2

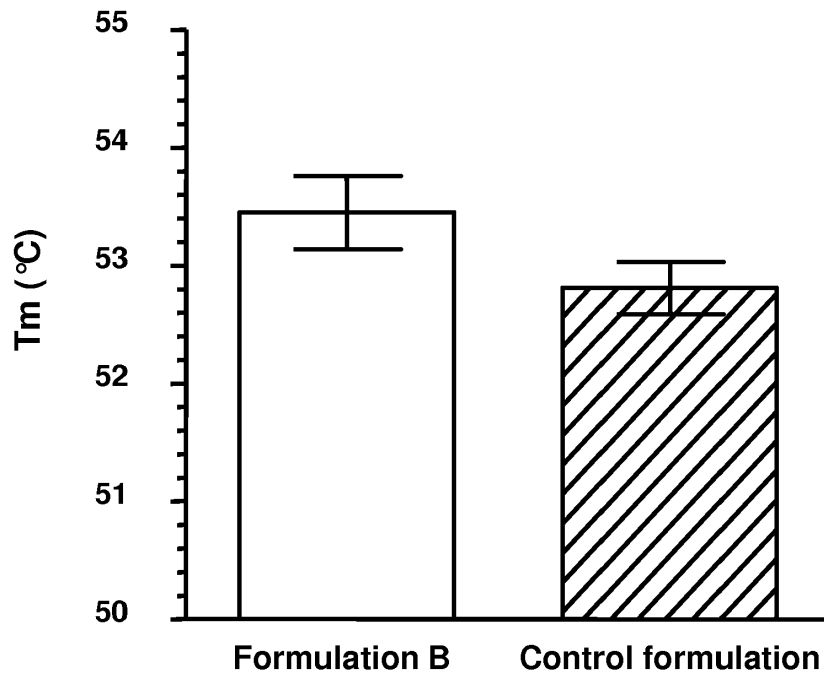


Fig. 3

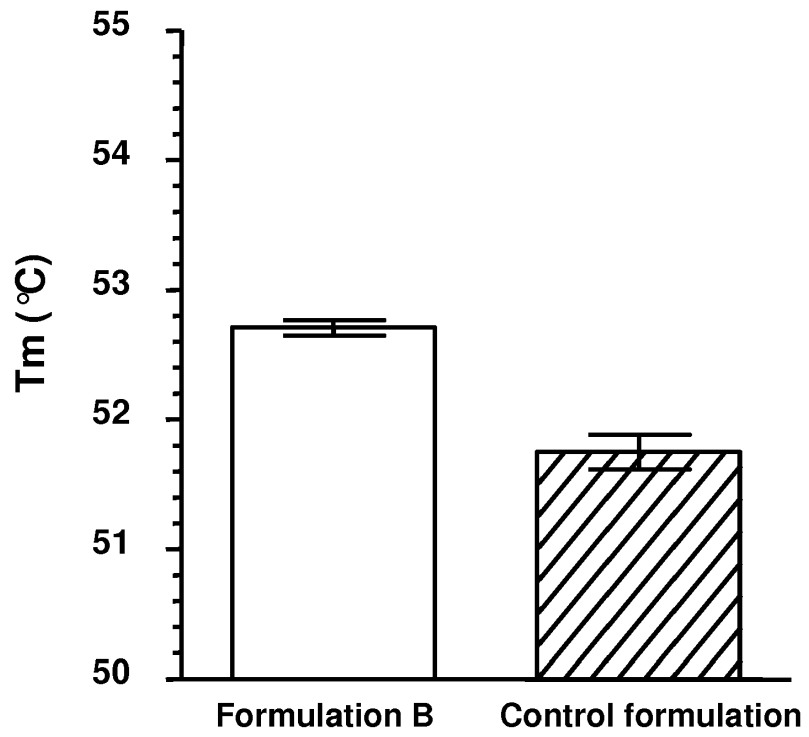


Fig. 4

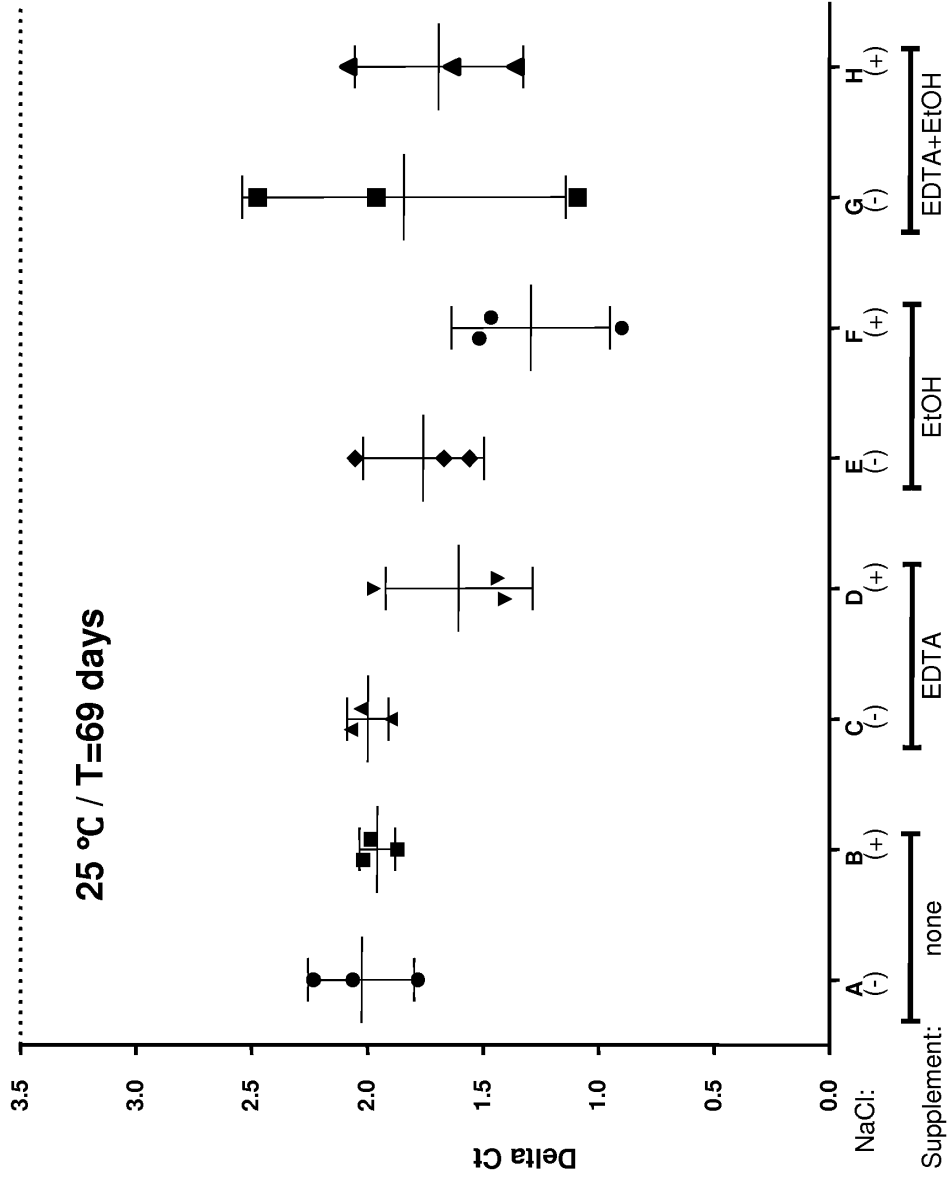


Fig. 5

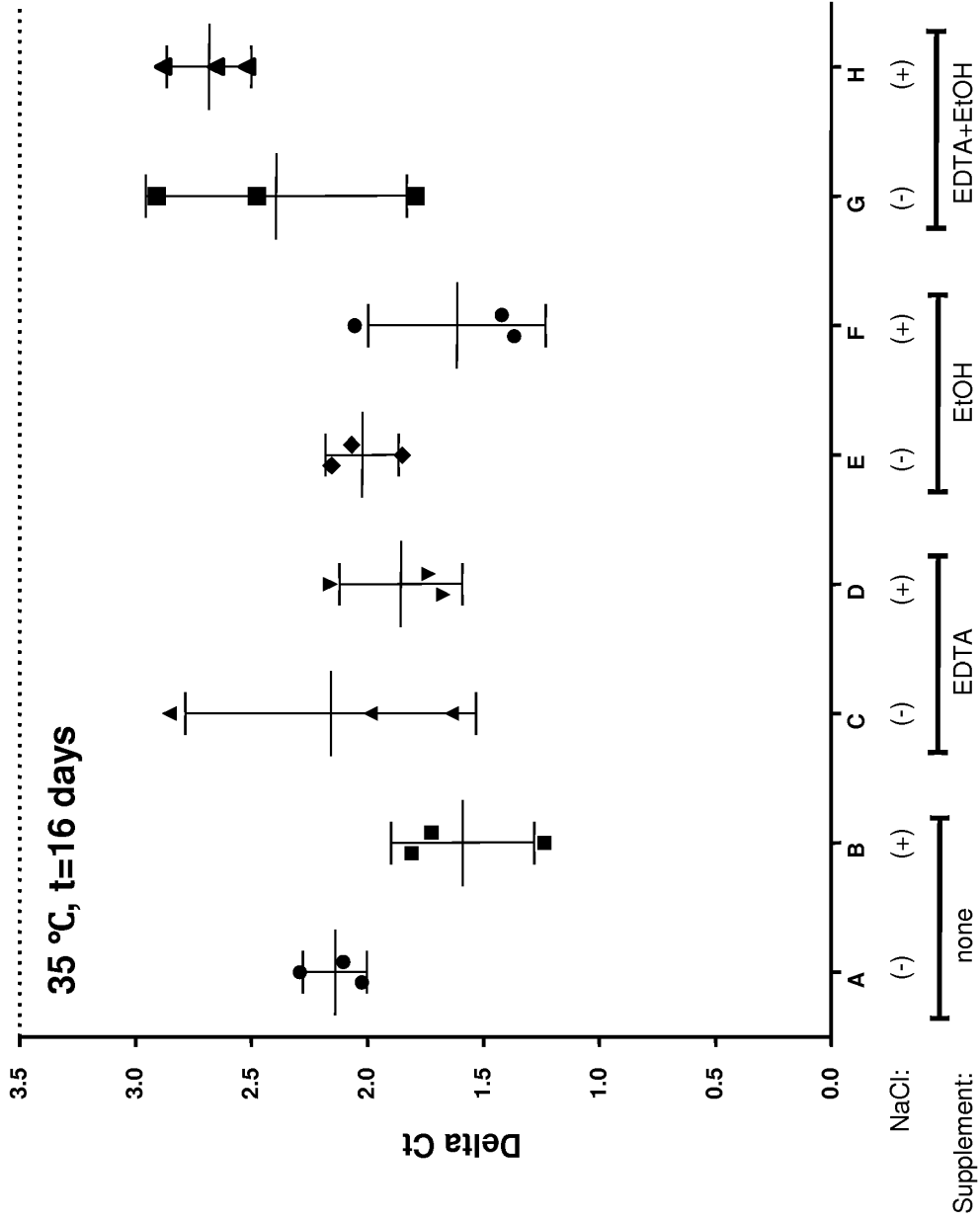


Fig. 6

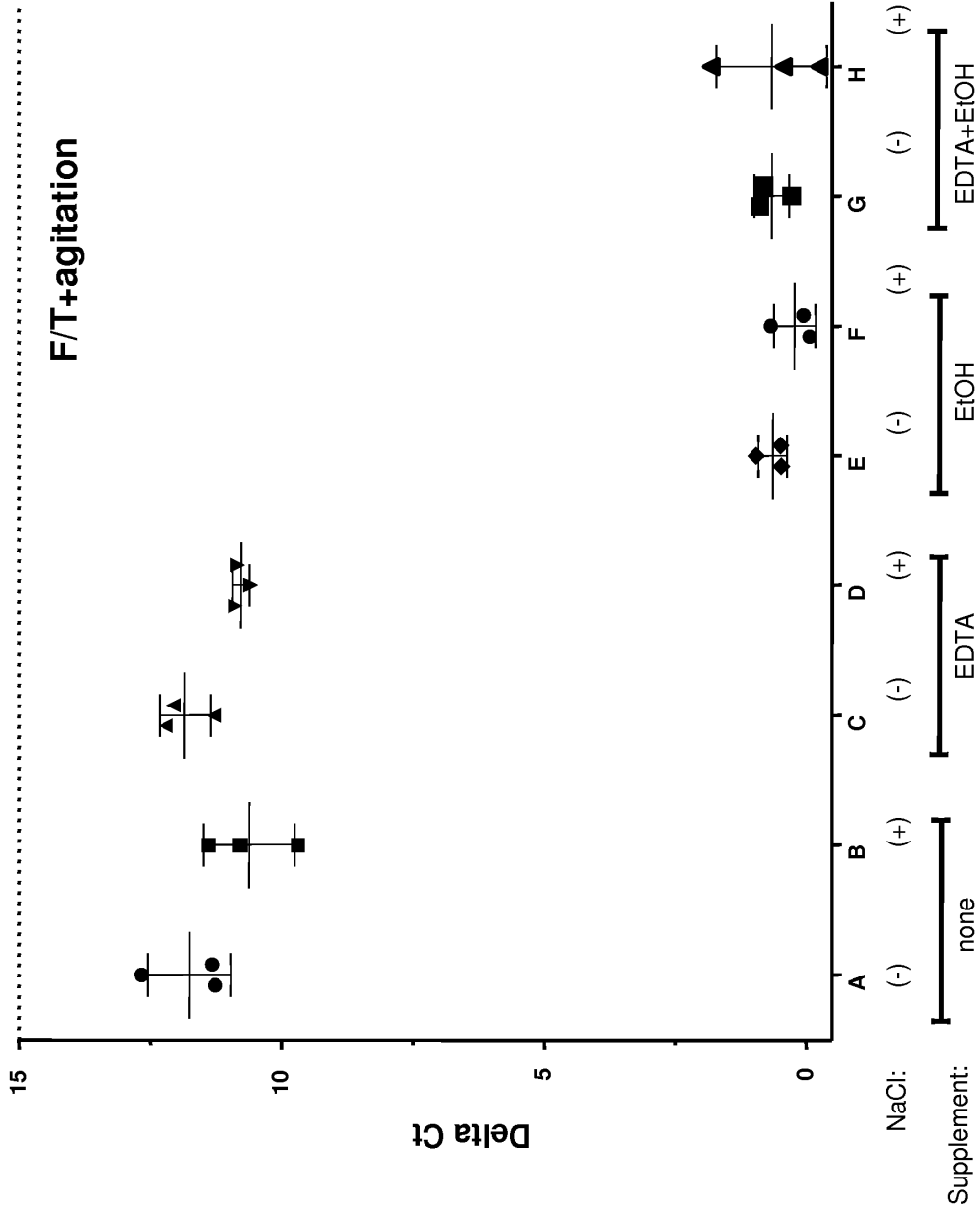
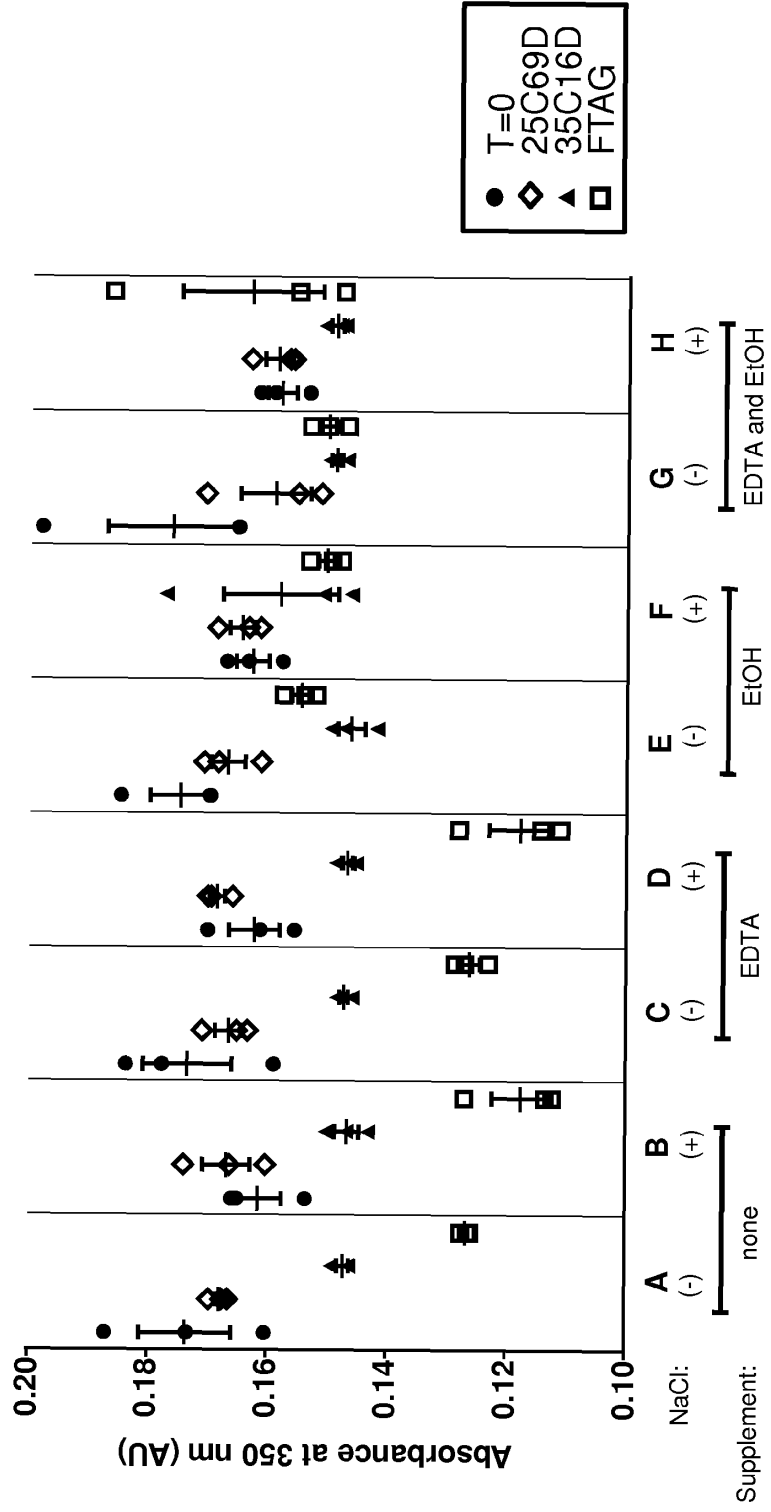
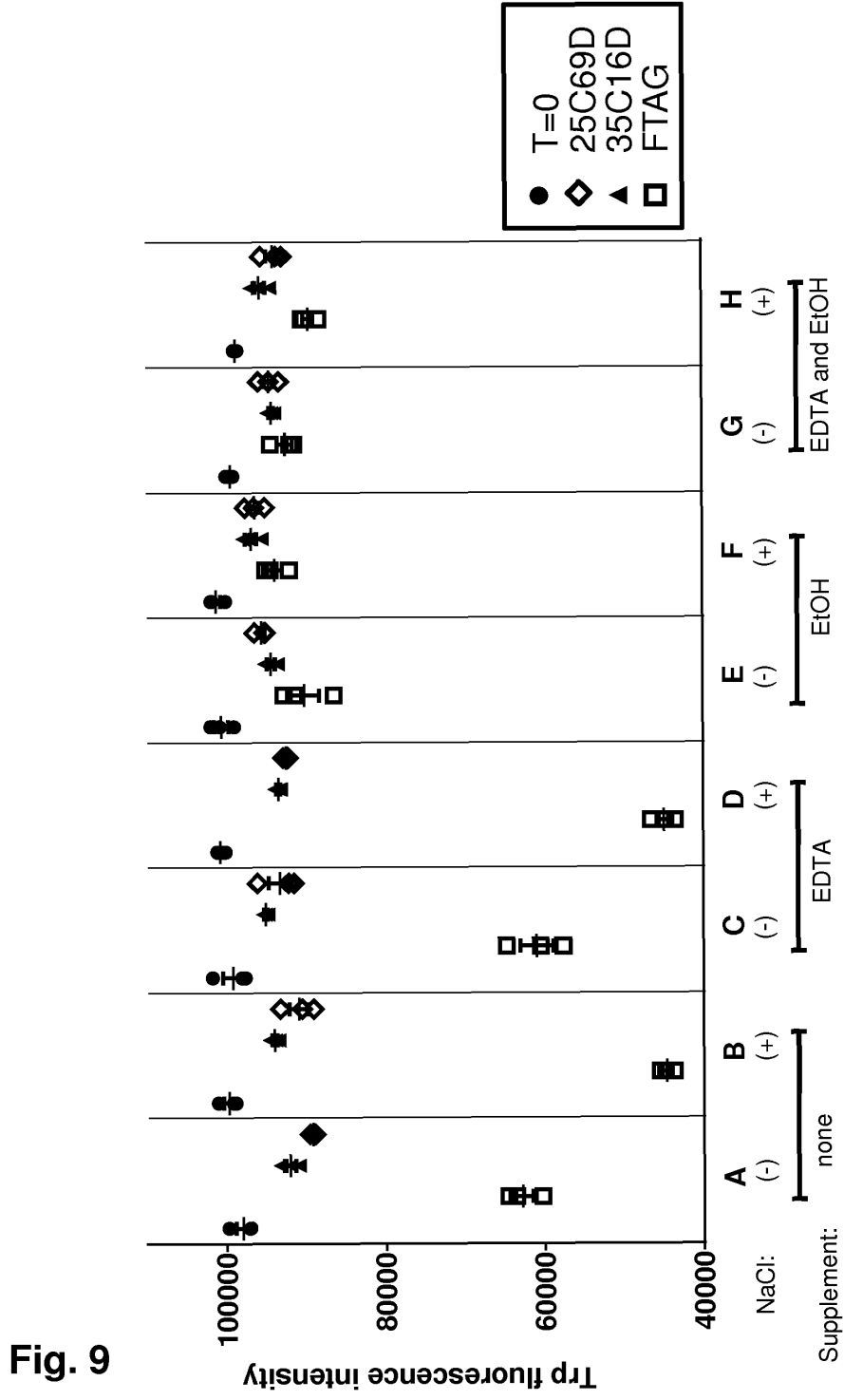


Fig. 7

Fig. 8





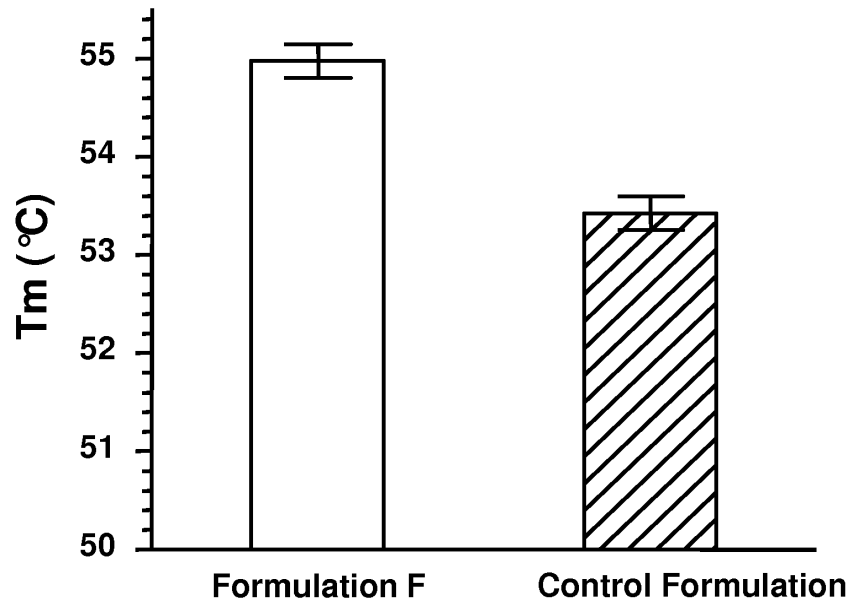
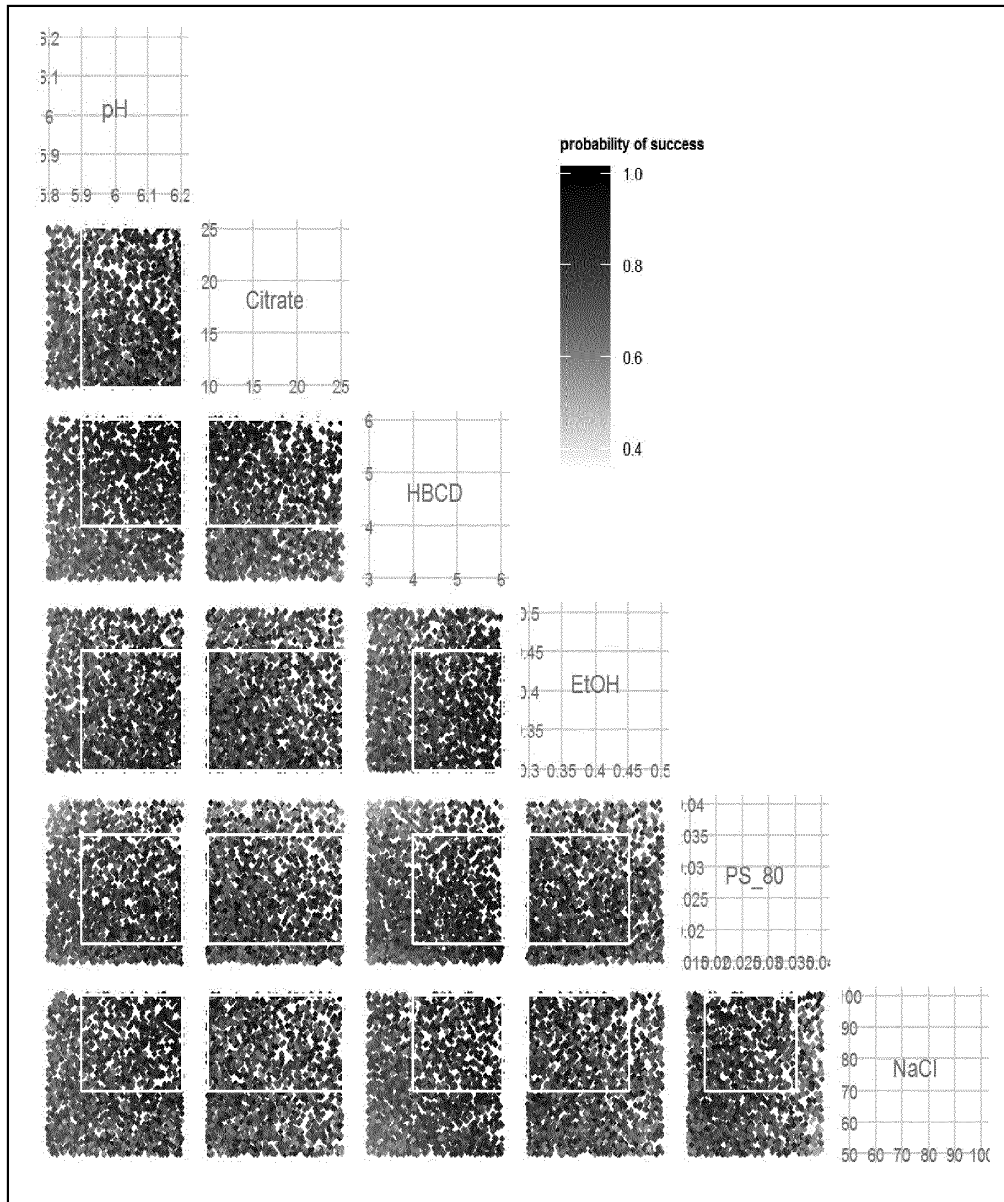


Fig. 10

**Fig. 11**