



(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 299 275**

(51) Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/32 (2006.01)

(12)

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(86) Número de solicitud europea: **99966096 .2**

(86) Fecha de presentación : **10.12.1999**

(87) Número de publicación de la solicitud: **1137758**

(87) Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2001**

(54) Título: **Procedimiento y composiciones para conservar adenovirus.**

(30) Prioridad: **10.12.1998 US 208666**

(45) Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.05.2008

(45) Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.05.2008

(73) Titular/es: **GENVEC, Inc.**
65 West Watkins Mill Road
Gaithersburg, Maryland 20878, US

(72) Inventor/es: **Kovesdi, Imre y**
Ransom, Stephen, C.

(74) Agente: **Carpintero López, Francisco**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y composiciones para conservar adenovirus.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a procedimientos y composiciones útiles en la conservación de adenovirus.

Antecedentes de la invención

10 Los virus (modificados y no modificados) tienen varias aplicaciones en la biología moderna en la que resulta deseable la conservación (mantenimiento o almacenamiento) del virus (por ejemplo en un stock o población del virus u otra composición que comprende un virus). Los virus modificados (también denominados vectores virales), por ejemplo, han resultado ser los sistemas vectores convenientes para aplicaciones terapéuticas y de investigación de transferencia
15 de genes. El uso de vectores virales en aplicaciones terapéuticas y de investigación necesita que los vectores virales sean transportados y almacenados durante un período de tiempo. Durante este período de almacenamiento, los vectores virales se mantienen de manera deseable sin pérdida significativa de infectividad, viabilidad y/o la capacidad del vector viral para producir un efecto deseado (por ejemplo, la estimulación de una respuesta inmune) o un producto deseado, por ejemplo un polipéptido viral de interés. Los virus no modificados y otros vectores virales son también
20 útiles en contextos similares y en otros contextos, por ejemplo la producción de una respuesta inmune contra el virus, o contra un componente del virus. En tales contextos, la conservación del virus no requiere típicamente la retención de la infectividad y/o la viabilidad del virus, pero el procedimiento de almacenamiento puede más bien (y frecuentemente busca) mantener (e inclusive a veces causar) la inactivación y/o atenuación del virus, pero almacenado de una manera en la que se retiene la propiedad deseada del virus (por ejemplo, la inmunogenicidad del virus o de los componentes del mismo).

En la conservación de virus viables (activos) (por ejemplo, vectores virales), se sabe que los virus pueden almacenarse congelados a temperaturas muy bajas, por ejemplo, - 80°C, sin que se produzca pérdida significativa de actividad; sin embargo, la necesidad de congeladores de baja temperatura, que no están extensamente disponibles, limita la práctica de este enfoque. La liofilización, o desecación por congelación y posterior sublimación en condiciones de vacío, es otra opción conocida para el almacenamiento de virus. Este procedimiento tiene desventajas ya que es caro, y, tras la reconstitución, la composición del virus queda frecuentemente durante períodos prolongados de tiempo a temperatura ambiente (es decir, 20-25°C). En las formulaciones de almacenamiento actualmente conocidas en la técnica, los virus activos pierden rápidamente viabilidad cuando se almacenan a temperatura ambiente. Las composiciones que contienen virus almacenadas en recipientes en formulaciones conocidas pierden frecuentemente viabilidad en períodos de tiempo cortos. Problemas similares se presentan cuando los vectores virales se secan a temperatura ambiente o a temperaturas más altas.

Anteriormente se ha descrito que el virus respiratorio sincitial (VRS) puede estabilizarse contra la inactivación térmica y los ciclos de congelación-descongelación (Gupta y col., en Vaccine (1996) Vol. 14, Nº 15, pág. 1417-1420). En ese estudio, pudieron estabilizarse virus en altas concentraciones durante tres días a 37°C usando agentes estabilizantes que incluyen sacarosa al 25%, trehalosa al 10%, y suero fetal de bovino (SFB) al 45%.

La patente de EEUU Nº 4.337.242 describe una vacuna líquida de virus vivo estabilizada que contiene un virus vivo, gelatina parcialmente hidrolizada, un monosacárido o disacárido, un medio de cultivo celular, ácido L-glutámico, L-arginina, y tampones ácidos fisiológicamente aceptables suficientes para mantener el pH en el intervalo desde aproximadamente 6,0 hasta aproximadamente 6,5. Como monosacárido, resulta de preferencia el sorbitol, mientras que la sacarosa, lactosa, y maltosa son los disacáridos de preferencia.

50 Croyle y col. (en Pharmaceutical Development and Technology (1998) Vol. 3, Nº 3, pág. 373-383) describen factores que influyen en la estabilidad de preparaciones adenovirales recombinantes para terapia génica humana. Las soluciones crioprotectoras que mantuvieron significativamente la estabilidad del virus durante un único ciclo de congelación-descongelación incluyeron sacarosa 0,5 M, trehalosa 0,5 M, y sorbitol al 10% / gelatina al 0,4%. Los estudios de estabilidad a largo plazo se realizaron a 4°C con preparaciones liofilizadas de sorbitol/gelatina y sacarosa. Ambas
55 formulaciones proporcionaron estabilidad adecuada para el adenovirus con 2,6 y 5,6 x 10¹¹ ufl/ml detectadas 150 días tras la desecación, respectivamente.

La Solicitud Internacional WO 98/02522 describe un procedimiento para conservar virus infecciosos recombinantes en forma congelada o líquida, en el que los virus se conservan en una solución acuosa que contiene sacarosa en una concentración superior a 0,75 M, de preferencia entre 0,75 y 1,5 M, o de más preferencia a una concentración de 1 M.

En vista de lo anterior, existe una necesidad de más procedimientos de almacenamiento o conservación de virus, y composiciones útiles en los mismos. En particular, existe una necesidad de procedimientos y composiciones para el almacenamiento de virus en composiciones líquidas, más que composiciones desecadas o congeladas, y en diversos recipientes. La presente invención proporciona tales procedimientos y composiciones. Estas y otras ventajas de la presente invención, así como otras características de la invención, resultarán evidentes a partir de la descripción de la invención que se proporciona en este documento.

Breve resumen de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento y una composición para conservar adenovirus, tales como vectores adenovirales. La presente invención proporciona un procedimiento para conservar un adenovirus que comprende la preparación de una composición líquida que comprende un adenovirus, un vehículo líquido, polisorbato 80, y trehalosa, y el posterior mantenimiento de la composición líquida a una temperatura por encima de 0°C durante al menos 1 día. La presente invención también proporciona una composición líquida que comprende un adenovirus, un vehículo líquido, polisorbato 80, y trehalosa, en la que la presencia de polisorbato 80 y trehalosa en la composición líquida estabiliza la actividad viral tal que la actividad viral disminuye como máximo un 20% tras mantener la composición líquida a una temperatura superior a 0°C durante 1 día.

Descripción detallada de la invención

La presente invención proporciona un procedimiento para conservar de manera satisfactoria (es decir, almacenar o mantener) un adenovirus en una composición líquida a temperatura por encima de 0°C durante un período de tiempo. El procedimiento comprende preparar una composición líquida que comprende un adenovirus, un vehículo líquido, y un agente estabilizante, y mantener posteriormente la composición líquida a una temperatura por encima de 0°C durante al menos 1 día. La presente invención también proporciona una composición líquida que comprende un adenovirus, un vehículo líquido, y un agente estabilizante, en la que la composición líquida puede mantenerse a una temperatura superior a 0°C durante 1 día sin que se produzca una disminución en la actividad viral mayor que aproximadamente 20%.

La presente invención puede practicarse con cualquier adenovirus adecuado, que incluye tanto a virus de tipo salvaje como a virus modificados (es decir, vectores virales, tales como vectores virales de transferencia de genes). En la técnica se conocen y están caracterizados virus adecuados. Los ejemplos de tales adenovirus pueden encontrarse en, por ejemplo, Fields y col., Virology (3ª edición, Lippincott-Raven (1996)).

La presente invención es particularmente útil para mantener un vector viral (a diferencia de un virus de tipo salvaje), por ejemplo, un vector viral de transferencia de genes para uso en terapia génica. El vector viral puede ser cualquier vector que, al menos en cierta parte significativa, sea (o sea similar a) un virus de tipo salvaje (por ejemplo, un vector de ADN modificado de origen viral). El virus es un adenovirus y de preferencia es un vector adenoviral. De mayor preferencia, el virus es un vector adenoviral de transferencia de genes (es decir, un adenovirus que comprende al menos un gen exógeno o modificado).

El virus se mantiene en una composición que está en forma líquida. De preferencia, la composición líquida es una composición farmacéutica. El término “líquido” como se usa para describir a la composición en el contexto de la presente invención significa que está constituido por, que contiene, o que está empapado con líquido que no es un sólido congelado. En otras palabras, la composición es parcial a totalmente líquida en la naturaleza, de preferencia completamente líquida.

El vehículo líquido puede ser cualquier vehículo líquido adecuado, por ejemplo, agua. De preferencia, el vehículo líquido es un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, particularmente cuando la composición líquida es una composición farmacéutica. El vehículo farmacéuticamente aceptable puede ser un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable que contenga un tampón (por ejemplo, un tampón tris) y una sal. En la técnica se conocen bien los ejemplos de tampones y sales adecuados, así como también otros tipos de vehículos farmacéuticamente aceptables.

El agente estabilizante es una combinación de trehalosa con polisorbato 80. Por supuesto, la composición líquida puede comprender muchas otras sustancias, por ejemplo otros agentes estabilizantes, tampones, o vehículos. En algunas formas de realización de la presente invención resulta deseable el uso de un sacárido diferente de la trehalosa en combinación con trehalosa (y/u otros agentes estabilizantes).

El agente estabilizante puede estar presente en la composición líquida en cualquier cantidad adecuada (por ejemplo, concentración). La trehalosa está presente de manera deseable en la composición líquida en una concentración de aproximadamente 2-10% (peso/volumen). La trehalosa está presente de preferencia en una concentración de 4-6% (peso/volumen), de más preferencia aproximadamente 5% (peso/volumen), mientras que el polisorbato 80 está presente de manera deseable en una concentración de aproximadamente 0,001-0,01% (peso/volumen), de más preferencia aproximadamente 0,0025% (peso/volumen).

El término “actividad” se usa en este documento con referencia a la viabilidad (por ejemplo, viabilidad real y/o potencial) del virus. La presente invención puede usarse para conservar (por ejemplo, almacenar) a virus “activos” y/o “inactivos”. El término “actividad”, como se usa para describir las formas de realización de la presente invención en las que el virus se mantiene en (o al menos puede ser reconstituido a) un estado activo, se refiere a cualquier medida adecuada de la viabilidad de una composición de un virus. En la técnica se conocen numerosas mediciones de la actividad viral y pueden usarse dentro del contexto de la presente invención. En cualquier momento particular de las pruebas, puede necesitarse algo de tiempo para probar la actividad del virus (por ejemplo, el tiempo suficiente para que el vector viral exhiba la característica a medir). Por ejemplo, si el tiempo de la prueba es el día cero (por ejemplo, una célula se infecta con un virus y posteriormente se almacena en la composición líquida el mismo día), puede necesitarse algo de tiempo en ese día para observar el rasgo medido.

Un ejemplo de una medida adecuada de actividad del virus (y por consiguiente de la actividad de la composición líquida) es la infectividad del virus. La infectividad puede determinarse por cualquier serie de ensayos adecuados conocidos en la técnica. La infectividad puede incluir la determinación del número de células infectadas de una población de células contactada con cierta concentración de virus en un momento particular. La infectividad puede determinarse también por medio de un ensayo convencional en placa en diferentes momentos usando cantidades similares del virus (o de la composición que comprende el virus) y medio celular similar. El ensayo de placa es una técnica virológica clásica, desarrollada originalmente para los bacteriófagos por Felix d'Herelle en 1917 y modificada posteriormente por Dulbecco y Vogt para los virus de mamíferos, y que todavía se usa ampliamente para la determinación de concentraciones virales observando la infectividad del virus (o de vectores) en una composición dada (o stock).

Frecuentemente resulta deseable usar técnicas diferentes del recuento de células o del ensayo de placas convencional, o técnicas basadas en ellas, tales como ensayos de placas modificados, o combinar el ensayo con el uso de un programa informático para facilitar la determinación de la actividad. Otros ensayos adecuados, y frecuentemente de preferencia, para determinar actividad incluyen la realización de ensayos inmunológicos de la producción de anticuerpos antivirales por una célula (por ejemplo, usando un ELISA o un ensayo de transferencia Western) y la medición de la producción de citocinas (por ejemplo, interferones) generados en respuesta a la introducción del virus en un huésped dado. Cuando la infectividad del virus se usa como evaluación de la actividad, se necesita que transcurra una cantidad de tiempo adecuada para la infección viral de una población de células previo a la determinación de la infectividad.

Como alternativa, la actividad viral puede determinarse examinando la capacidad del virus para producir los productos dentro de una célula huésped, por ejemplo, una proteína, polipéptido, glicoproteína, o ARN viral específico. Cuando el virus es un vector de transferencia de genes virales, la actividad es de manera deseable una medida de la cantidad de producto genético producido por las células (por ejemplo, células 293 o de preferencia células A549) infectadas por una muestra que comprende el vector viral de transferencia de genes. La medición de tal proteína u otro producto del virus (como con otras mediciones de actividad) puede llevarse a cabo por medio de cualquier técnica apropiada. Por ejemplo, pueden determinarse los microgramos de producto producido por microlitro de la composición líquida bajo condiciones similares en diferentes momentos de prueba.

La técnica de medición precisa para la actividad viral dependerá, hasta cierto punto, de la composición líquida en particular, especialmente del virus concreto que se conserva en ella, por ejemplo, la naturaleza del vector viral de transferencia de genes y producto(s) producido(s) por el mismo. Un experto en la técnica puede determinar y utilizar fácilmente técnicas adecuadas de medición de actividad viral. De hecho, las técnicas para llevar a cabo los ensayos discutidos anteriormente son bien conocidas en la técnica. Tales técnicas se discuten más, por ejemplo, en Fields y col., *Virology* (3ª edición, Lippincott-Raven (1996)), y Sambrook y col., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, NY (1989).

La temperatura a la que se mantiene la composición líquida puede ser cualquier temperatura adecuada para mantener el virus en su estado deseado durante el período de tiempo de almacenamiento. Típicamente, la composición se mantiene a una temperatura por encima de 0°C, (por ejemplo, a una temperatura de 2°C, 4°C, 10°C, 20°C, 28°C, ó 37°C, o superior a cualquiera de las anteriores), de preferencia a 2°C o superior (por ejemplo, 2-10°C), y de más preferencia a 4°C o superior (por ejemplo, 4-10°C). La composición líquida puede también mantenerse a una temperatura de 10°C o superior (por ejemplo, 10-20°C), 20°C o superior (por ejemplo, 20-25°C), o inclusive 30°C o superior (por ejemplo, 30-40°C), tal como puede encontrarse bajo condiciones de entorno no controladas ambientalmente (que pueden dar lugar a que la composición de virus esté expuesta a una diversidad de temperaturas diferentes a las temperaturas de congelación, por ejemplo, 4-37°C).

El virus puede mantenerse en la composición líquida durante diversos períodos de tiempo. La composición líquida se mantiene de manera deseable a cualquiera de las temperaturas mencionadas anteriormente durante al menos 1 día (por ejemplo, 7 días (1 semana) o más). Típicamente, el período será mayor, tal como por ejemplo al menos 3, 4, 5, ó 6 semanas, o incluso más, tal como por ejemplo al menos 10, 20, 30, 40, ó 50 semanas.

La presente invención permite la conservación de la actividad viral durante el almacenamiento de un virus a cualquiera de las temperaturas mencionadas anteriormente y durante cualquiera de los períodos de tiempo mencionados. Cuando se desea mantener la actividad viral (por ejemplo, cuando el virus es un vector viral de transferencia de genes), la presente invención permite de manera deseable que la disminución de actividad viral sea no significativa o sustancial (si acaso se produce) a cualquiera de las temperaturas de almacenamiento anteriormente mencionadas y durante cualquiera de los períodos de tiempo mencionados, aunque cierta pérdida de actividad viral es aceptable, especialmente con temperaturas de almacenamiento relativamente más elevadas y/o con tiempos de almacenamiento relativamente más largos. Más particularmente, el procedimiento y la composición de la presente de invención de manera deseable conservan un virus a cualquiera de las temperaturas mencionadas anteriormente y durante cualquiera de los períodos de tiempo mencionados sin una disminución en la actividad viral mayor que aproximadamente 50%, de preferencia sin una disminución en la actividad viral mayor que aproximadamente 40%, y de más preferencia sin una disminución en la actividad viral mayor que aproximadamente 30%. En algunas formas de realización, especialmente a temperaturas relativamente más bajas y/o durante intervalos de tiempo relativamente más cortos, el presente procedimiento y la composición de la invención conservan de manera deseable un virus a cualquiera de las temperaturas anteriormente mencionadas y durante cualquiera de los períodos de tiempo mencionados sin una disminución en la actividad viral mayor que aproximadamente 20%, de preferencia sin una disminución en la actividad viral mayor que aproximadamente 10%, y de más preferencia sin una disminución en la actividad viral mayor que aproximadamente 5%.

A veces, el mantenimiento de la actividad viral no es necesario o no resulta deseable (por ejemplo, cuando el virus se usa para inducir una respuesta inmune). Por consiguiente, la composición líquida puede mantenerse a una temperatura y durante un período de tiempo tal que la inactivación o atenuación del virus se produce y/o se mantiene adecuadamente, pero en la que el virus es aún adecuado para su uso proyectado tras el período de almacenamiento (por ejemplo, se provoca una respuesta inmune deseada por el virus incluso tras el período de tiempo de almacenamiento).

La composición líquida puede tener cualquier pH adecuado. Un pH adecuado en el contexto de la presente invención es cualquier pH en el que se mantiene el virus en la composición líquida en un estado que permite su utilización posterior para el objeto proyectado (por ejemplo, expresión genética para producir una proteína o estimulación de una respuesta inmune). El pH de la composición líquida es de manera deseable de aproximadamente 6-9, por ejemplo, aproximadamente 6-8,5, aunque la composición líquida puede tener un pH más bajo o más alto, particularmente con el uso de tampones. La composición líquida tiene de preferencia un pH de aproximadamente 7-8,5, de más preferencia de aproximadamente 7,5-8, y de mayor preferencia de aproximadamente 7,8. La composición líquida con un pH algo superior a 7 (por ejemplo, de aproximadamente 7,6 o de aproximadamente 7,8) pero inferior a aproximadamente 8,5 resulta particularmente de preferencia cuando la composición líquida se almacena en un tampón tris a temperaturas más altas ya que las disminuciones en el pH en tampones tris se asocian comúnmente con temperaturas elevadas (por ejemplo, de aproximadamente 28°C ó 37°C). Por otra parte, en composiciones farmacéuticas resulta también deseable mantener el pH en o por encima de 7 para evitar los efectos laterales físicos negativos conocidos por estar asociados con las composiciones de pH más bajo introducidas en los huéspedes mamíferos, particularmente seres humanos.

Si la conservación de la actividad viral no es necesaria y/o no resulta deseable (tal como para el almacenamiento de virus inactivados o atenuados), el pH de la composición líquida de manera deseable puede estar por encima o por debajo del intervalo deseable para la retención de la actividad del virus (por ejemplo, debajo de aproximadamente pH 6 o por encima de aproximadamente pH 8,5), mientras el pH permanezca en un intervalo adecuado para el almacenamiento del virus para su uso proyectado (por ejemplo, causar una respuesta inmune). Por ejemplo, si el virus es un virus inactivado o atenuado para uso en la estimulación de una respuesta inmune, la composición líquida puede mantenerse a un pH (y/o a una temperatura) tal que el virus atenuado o inactivado se mantiene en su estado atenuado o inactivado.

La composición líquida puede colocarse (por ejemplo, mantenerse o almacenarse) en cualquier recipiente adecuado. Típicamente, el recipiente comprenderá, estará esencialmente constituido por, o estará constituido por vidrio o plástico. El plástico puede estar compuesto de, por ejemplo, cualquier polímero adecuado, particularmente una poliolefina, tal como polipropileno o polietileno, especialmente polipropileno. El recipiente puede estar silanizado o tener un recubrimiento sobre el mismo.

Ejemplos

La presente invención se describe además en los siguientes ejemplos. Los ejemplos sirven solamente para ilustrar la invención y no pretenden limitar de ninguna manera el alcance de la invención.

Ejemplo Comparativo 1

Este ejemplo compara el efecto de diversos sacáridos en la conservación de una composición de vectores virales.

Se preparó una serie de composiciones líquidas. Cada composición contenía un vector adenoviral, agua, Tris 10 mM (pH 7,8 a temperatura ambiente (es decir, 20-25°C)), NaCl 75 mM, y uno de los siguientes sacáridos al 2% (peso/volumen), 3% (peso/volumen), 5% (peso/volumen), o al 10% (peso/volumen): sorbital, trehalosa, sacarosa, manitol, o dextrosa. El vector adenoviral era deficiente en E1 y E3 con un gen informador, fosfatasa alcalina secretable (SEAP), bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV), insertado en la región E1. Se almacenó cada composición a 37°C durante 7 días, y posteriormente se determinó la actividad de la composición. La actividad se determinó por medición de la cantidad de SEAP producida tras la infección de las células A549 con una muestra de la composición del vector adenoviral. En la Tabla 1 se presenta la disminución por ciento en la actividad para cada composición.

TABLA 1

Disminución Por Ciento en Actividad de Vectores Adenovirales Almacenados a 37 °C durante 7 Días				
Sacárido	al 2% p/v	al 3% p/v	al 5% p/v	al 10% p/v
Sorbital	100	100	99	99
Trehalosa	57	42	28	25
Sacarosa	100	100	100	99
Manitol	100	100	100	99
Dextrosa	100	100	100	100

Como resulta evidente de los resultados experimentales presentados en la Tabla 1, la trehalosa fue el agente estabilizante más eficaz para el vector adenoviral almacenado durante siete días a 37°C. Los otros sacáridos - sorbital, sacarosa, manitol y dextrosa - exhibieron poco o ningún efecto estabilizante sobre los vectores adenovirales. Estos resultados demuestran que la trehalosa estabiliza las composiciones de vectores virales suficientemente tal que los vectores virales pueden almacenarse durante 7 días en condiciones de entorno no controladas ambientalmente, por ejemplo, a temperaturas de hasta 37°C. Se realizaron experimentos similares con el gen del factor de crecimiento de vascular endotelial (VEGF) insertado en la región E1 del vector adenoviral en lugar del gen de SEAP y también se observaron resultados similares a los descritos en este documento. Por otra parte, estos resultados demuestran que la trehalosa es superior a otros sacáridos (sorbital, manitol y dextrosa) y disacáridos (sacarosa) para conservar la actividad de composiciones que contienen virus.

Ejemplo Comparativo 2

Este ejemplo ilustra la capacidad de la trehalosa para estabilizar una composición que contiene virus.

Se prepararon composiciones líquidas según el Ejemplo 1, excepto en que solamente se usó trehalosa como el agente estabilizante en una concentración de 5% (peso/volumen). Las composiciones se almacenaron a diversas temperaturas - 4°C, 25°C, ó 37°C - durante diversos períodos de tiempo - 1 día, 1 semana, 3 semanas, 6 semanas, 11 semanas, 19 semanas, 21 semanas, 31 semanas, 41 semanas, y 52 semanas - en un estado líquido. La actividad de cada composición se determinó de la misma manera que se presentó en el Ejemplo 1 tras el período de almacenamiento indicado, y en la Tabla 2 se presenta la disminución por ciento en la actividad para cada composición.

TABLA 2

Disminución Por Ciento en Actividad de Vectores Adenovirales			
Almacenados con Trehalosa al 5% (peso/volumen)			
Tiempo	4 °C	25 °C	37 °C
1 día	2	7	0
1 semana	2	23	66
3 semanas	2	28	90
6 semanas	0	53	100
11 semanas	10	79	100
19 semanas	15	94	100
21 semanas	15	97	100
31 semanas	15	100	100
41 semanas	16	100	100
52 semanas	18	100	100

Como resulta evidente de los resultados experimentales presentados en la Tabla 2, la trehalosa al 5% (peso/volumen) fue más eficaz para estabilizar el vector adenoviral bajo condiciones de almacenamiento a 4°C. La actividad de la composición del vector adenoviral tras 11 semanas había disminuido sólo aproximadamente 10%, y a las 52 semanas había disminuido sólo aproximadamente 18%. A temperatura ambiente (es decir, 20-25°C), la actividad de la composición del vector adenoviral había disminuido aproximadamente 25% tras 1 semana, aproximadamente 79% tras 11 semanas, y aproximadamente 100% a las 31 semanas. Para las composiciones del vector adenoviral almacenadas a 37°C, la actividad disminuyó aproximadamente 70% tras 1 semana y aproximadamente 100% tras 6 semanas. Estos resultados demuestran que la trehalosa al 5% (peso/volumen) estabiliza un virus activo en un intervalo de temperaturas y durante períodos de tiempo prolongados.

Ejemplo 3

Este ejemplo ilustra la capacidad de la trehalosa y del polisorbato 80 para actuar como agente estabilizante para los virus activos.

Se prepararon las composiciones líquidas según el Ejemplo 1, excepto en que se usó trehalosa al 5% (peso/volumen) y polisorbato 80 al 0,0025% (peso/volumen) como agente estabilizante. Las composiciones se almacenaron y evaluaron de la misma manera que se presentó en el Ejemplo 2. La actividad de cada composición se determinó de la misma

manera semejante que se presentó en el Ejemplo 1 tras el período de almacenamiento indicado, y en la Tabla 3 se presenta la disminución por ciento en la actividad para cada composición.

TABLA 3

Disminución Por Ciento en Actividad de Vectores Adenovirales con Trehalosa y Polisorbato 80			
Tiempo	4 °C	25 °C	37 °C
1 día	0	5	14
1 semana	0	6	41
3 semanas	5	25	84
6 semanas	0	44	100
11 semanas	5	77	100
19 semanas	6	92	100
21 semanas	8	96	100
31 semanas	6	100	100
41 semanas	6	100	100
52 semanas	7	100	100

Como resulta evidente de los resultados experimentales presentados en la Tabla 3, la trehalosa y el polisorbato 80 fueron más eficaces para estabilizar el vector adenoviral bajo condiciones de almacenamiento a 4°C. Tras 1 semana, la actividad de la composición del vector adenoviral no había disminuido significativamente; tras 11 semanas, la actividad había disminuido sólo aproximadamente 5%, e incluso tras 52 semanas la actividad de la composición del vector adenoviral había disminuido sólo aproximadamente 7%. A temperatura ambiente (es decir, 20-25°C), la actividad de la composición del vector adenoviral había disminuido aproximadamente 50% tras 6 semanas, y aproximadamente 80% tras 11 semanas. Para las composiciones del vector adenoviral almacenadas a 37°C, la actividad disminuyó aproximadamente 40% tras 1 semana, y aproximadamente 85% tras 3 semanas. Estos resultados demuestran que la trehalosa y el polisorbato 80 son eficaces para estabilizar un virus activo (por ejemplo, un vector viral) en un intervalo de temperaturas durante períodos de tiempo prolongados.

Ejemplo Comparativo 4

Este ejemplo ilustra además la capacidad de diversos excipientes para estabilizar composiciones de vectores virales.

Se prepararon tres composiciones líquidas de una manera similar a la presentada en el Ejemplo 1. Cada composición contenía un vector adenoviral, agua, Tris 10 mM (pH 7,8 a temperatura ambiente (es decir, 20-25°C)), NaCl 75 mM, sacarosa al 3% (peso/volumen), y polisorbato 80 al 0,0025% (peso/volumen), L-arginina 20 mM, o polivinilpirrolidona al 0,1% (peso/volumen). Cada composición se almacenó a 37°C durante 4 días, y a continuación se determinó la actividad de la composición de la misma manera que se presentó en el Ejemplo 1. En la Tabla 4 se presenta la disminución por ciento en la actividad para cada composición.

TABLA 4

Disminución Por Ciento en Actividad de Vectores Adenovirales Almacenados a 37 °C Durante 4 Días	
Estabilizante	
Polisorbato 80	31
L-arginina	42
Polivinilpirrolidona	53

ES 2 299 275 T3

Como resulta evidente de los resultados experimentales presentados en la Tabla 4, el polisorbato 80 tuvo un efecto estabilizante sobre la actividad de los vectores adenovirales (disminución de la actividad de aproximadamente 30%), mientras que L-arginina y polivinilpirrolidona exhibieron un efecto estabilizante algo inferior sobre el vector adenoviral a 37°C (disminuciones en la actividad de aproximadamente 40% y 50%, respectivamente). Estos resultados demuestran que polisorbato 80, L-arginina, y polivinilpirrolidona pueden ser útiles, solos o de preferencia en combinación con otros agentes estabilizantes, para conservar los virus activos, por ejemplo, vectores virales.

Ejemplo 5

Este ejemplo demuestra la capacidad superior de la trehalosa sola y en combinación con polisorbato 80 para estabilizar vectores virales en recipientes de vidrio y de plástico.

Se prepararon las composiciones líquidas de una manera similar a la presentada en el Ejemplo 1. Cada composición contenía un vector adenoviral, agua, Tris 10 mM (pH 7,8 a temperatura ambiente (es decir, 20-25°C)), NaCl 75 mM, y sacarosa al 3%, trehalosa al 5%, o una combinación de trehalosa al 5% y 25 ppm de polisorbato 80. Se preparó también una composición con el vector adenoviral, agua, Tris 10 mM (pH 7,8 a temperatura ambiente (es decir, 20-25°C)), NaCl 150 mM, MgCl₂ 10 mM, y sacarosa al 3%. Las muestras de cada composición se colocaron en recipientes del plástico (polipropileno), y se colocaron muestras relativamente equivalentes de cada composición en recipientes de vidrio. Las muestras de las composiciones se almacenaron a continuación a 4°C ó 25°C, y se determinó la actividad de las composiciones en los diversos puntos de tiempo, es decir, inicialmente (0 semanas), a las 3 semanas, a las 6 semanas, y a las 11 semanas, así como a 1 día y a 1 semana para aquellas composiciones en los recipientes de plástico. La actividad de las composiciones se determinó de la misma manera que se presentó en el Ejemplo 1. En las Tablas 5a y 5b se presenta la disminución por ciento en la actividad para cada composición.

Tabla 5a – Disminución Por Ciento en Actividad de Vectores Adenovirales Almacenados en Recipientes de Vidrio en Diversas Composiciones Durante el Tiempo

	Trehalosa y Polisorbato 80 a 4 °C	Trehalosa y Polisorbato 80 a 25 °C	Trehalosa a 4 °C	Trehalosa a 25 °C	Sacarosa a 4 °C	Sacarosa a 25 °C	Sacarosa y MgCl ₂ a 4 °C	Sacarosa y MgCl ₂ a 25 °C
0 Semanas	0	0	0	0	0	0	0	0
3 Semanas	0	9	11	25	51	70	53	84
6 Semanas	0	45	6	44	48	75	73	95
11 Semanas	16	71	10	74	81	99	94	100

Tabla 5b – Disminución Por Ciento en Actividad de Vectores Adenovirales Almacenados en Recipientes de Plástico en Diversas Composiciones Durante el Tiempo

	Trehalosa y Polisorbato 80 a 4 °C	Trehalosa y Polisorbato 80 a 25 °C	Trehalosa a 4 °C	Trehalosa a 25 °C	Sacarosa a 4 °C	Sacarosa a 25 °C	Sacarosa y MgCl ₂ a 4 °C	Sacarosa y MgCl ₂ a 25 °C
0	0	0	0	0	0	0	0	0
Semanas								
1 Día	0	6	3	8	74	81	79	95
1	1	8	3	24	100	100	99	100
Semana								
3	7	27	2	29	100	100	100	100
Semanas								
6	0	46	0	54	100	100	100	100
Semanas								
11	7	77	9	79	100	100	100	100
Semanas								

Como resulta evidente de los resultados experimentales presentados en la Tabla 5a, la trehalosa sola tuvo un efecto estabilizante significativo sobre la actividad de los vectores adenovirales almacenados en los recipientes de vidrio (disminución de la actividad de aproximadamente 10-25% a 4°C y 25°C tras 3 semanas). Los resultados además indican que la combinación de trehalosa y polisorbato 80 proporcionó una retención de la actividad de la composición del vector adenoviral tan buena, sino mejor en un recipiente de vidrio (disminución de la actividad de aproximadamente 0-10% a 4°C y 25°C tras 3 semanas). La trehalosa sola y en combinación con polisorbato 80 fue particularmente eficaz para retener la actividad de la composición del vector adenoviral a temperaturas más bajas en los recipientes de vidrio (disminución de la actividad de aproximadamente 10-20% a 4°C tras 11 semanas). Por el contrario, la sacarosa no aseguró una buena retención de la actividad de la composición del vector adenoviral en un recipiente de vidrio (disminución de la actividad de aproximadamente 50-85% a 4°C y 25°C tras sólo 3 semanas y disminución de la actividad de aproximadamente 80-95% a 4°C tras 11 semanas).

Los resultados presentados en la Tabla 5b muestran que la trehalosa sola o con el polisorbato 80 como el agente estabilizante también tuvo un efecto estabilizante superior similar sobre la actividad de los vectores adenovirales almacenados en los contenedores de plástico (disminución de la actividad de aproximadamente 0-30% a 4°C y 25°C tras 3 semanas). Las composiciones del vector adenoviral mantenidas con sacarosa como el agente estabilizante en contenedores de plástico perdieron toda la actividad viral bajo mismas condiciones.

Estos resultados demuestran además que la diferencia en la capacidad de la trehalosa sola y con polisorbato 80 para conservar el vector adenoviral en recipiente de plástico, comparada con las otras composiciones probadas, fue significativamente mayor que las diferencias observadas en recipientes de vidrio. Por ejemplo, las composiciones que contenían sacarosa tuvieron una reducción en la actividad viral de aproximadamente 100% a 4°C tras sólo 3 semanas en el recipiente de plástico comparado con la reducción en la actividad viral de aproximadamente 50% bajo las mismas condiciones en el recipiente de vidrio, mientras que las composiciones que contenían trehalosa se comportaron de manera similar en los recipientes de plástico y de vidrio con disminución de la actividad viral de sólo aproximadamente 0-10% a 4°C tras 3 semanas.

Estos resultados demuestran que la trehalosa puede ser útil, sola o de preferencia en combinación con polisorbato 80, para conservar composiciones de vectores virales en recipientes de plástico y de vidrio. Por otra parte, estos resultados demuestran que la presente invención proporciona retención de la actividad de la composición del vector viral significativamente mejor que otras composiciones tanto en recipientes de plástico como de vidrio.

El uso de los términos “un”, “una”, “el”, “la” y referencias similares (por ejemplo “un vector adenoviral” o “una composición líquida”) en el contexto de la descripción de la presente invención (especialmente en el contexto de las siguientes reivindicaciones) tiene la intención de cubrir el singular y el plural, a menos que se indique de otra manera en este documento o se contradiga claramente por contexto.

ES 2 299 275 T3

Aunque esta invención se ha descrito con una énfasis sobre las formas de realización de preferencia, resultará evidente para aquellos expertos en la técnica que pueden usarse variaciones de las formas de realización de preferencia y que se pretende que la invención pueda ponerse en práctica de manera diferente a la específicamente descrita en este documento.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para conservar un adenovirus, comprendiendo el procedimiento:

(a) preparar una composición líquida que comprenda

(i) un adenovirus,

(ii) un vehículo líquido,

(iii) monooleato de polioxietileno (20) sorbitán (polisorbato 80), y

(iv) trehalosa; y

(b) mantener la composición líquida a una temperatura por encima de 0°C durante al menos 1 día.

2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la trehalosa está presente en la composición líquida en una concentración de aproximadamente 2-10% (peso/volumen).

3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que la trehalosa está presente en la composición líquida en una concentración de aproximadamente 4-6% (peso/volumen).

4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en el que el polisorbato 80 está presente en la composición líquida en una concentración de aproximadamente 0,001-0,01% (peso/volumen).

5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que la composición líquida además comprende un sacárido diferente de trehalosa.

6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, en el que la composición líquida se mantiene a una temperatura por encima de 0°C durante al menos 7 días, y en el que la presencia de polisorbato 80 y trehalosa en la composición líquida estabiliza la actividad viral tal que la actividad viral disminuye como máximo 20% tras mantener la composición líquida a una temperatura por encima de 0°C durante al menos 7 días.

7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en el que la composición líquida se mantiene a una temperatura de aproximadamente 25°C o más durante al menos 7 días, y en el que la presencia de polisorbato 80 y trehalosa en la composición líquida estabiliza la actividad viral tal que la actividad viral disminuye como máximo 50% tras mantener la composición líquida a una temperatura de aproximadamente 25°C o más durante al menos 7 días.

8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que la composición líquida se mantiene a una temperatura por encima de 0°C durante al menos 10 semanas, y en el que la presencia de polisorbato 80 y trehalosa en la composición líquida estabiliza la actividad viral tal que la actividad viral disminuye como máximo 50% tras mantener la composición líquida a una temperatura superior a 0°C durante al menos 10 semanas.

9. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que la composición líquida es una composición farmacéutica, el vehículo líquido es un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, y el adenovirus es un vector adenoviral de transferencia de genes.

10. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la composición líquida se mantiene en un recipiente de plástico.

11. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-9, en el que la composición líquida se mantiene en un recipiente de vidrio.

12. Una composición líquida que comprende:

(i) un adenovirus,

(ii) un vehículo líquido,

(iii) monooleato de polioxietileno (20) sorbitán (polisorbato 80), y

(iv) trehalosa,

en la que la presencia de polisorbato 80 y trehalosa en la composición líquida estabiliza la actividad viral tal que la actividad viral disminuye como máximo 20% tras mantener la composición líquida a una temperatura por encima de 0°C durante 1 día.

ES 2 299 275 T3

13. La composición líquida de la reivindicación 12, en la que la trehalosa está presente en la composición líquida en una concentración de aproximadamente 2-10% (peso/volumen).

5 14. La composición líquida de la reivindicación 13, en la que la trehalosa está presente en la composición líquida en una concentración de aproximadamente 4-6% (peso/volumen).

15. La composición líquida de cualquiera de las reivindicaciones 12-14, en la que el polisorbato 80 está presente en la composición líquida en una concentración de aproximadamente 0,001-0,01% (peso/volumen).

10 16. La composición líquida de cualquiera de las reivindicaciones 12-15, en la que la composición líquida además comprende un sacárido diferente de trehalosa.

15 17. La composición líquida de cualquiera de las reivindicaciones 12-16, en la que la presencia de polisorbato 80 y trehalosa en la composición líquida estabiliza la actividad viral tal que la actividad viral disminuye como máximo 20% tras mantener la composición líquida a una temperatura por encima de 0°C durante 7 días.

20 18. La composición líquida de cualquiera de las reivindicaciones 12-17, en la que la presencia de polisorbato 80 y trehalosa en la composición líquida estabiliza la actividad viral tal que la actividad viral disminuye como máximo 50% tras mantener la composición líquida a una temperatura por encima de 25°C durante 7 días.

19. La composición líquida de cualquiera de las reivindicaciones 12-18, en la que la presencia de polisorbato 80 y trehalosa en la composición líquida estabiliza la actividad viral tal que la actividad viral disminuye como máximo 50% tras mantener la composición líquida a una temperatura por encima de 0°C durante 10 semanas.

25 20. La composición líquida de cualquiera de las reivindicaciones 12-19, en la que la composición líquida es una composición farmacéutica, el vehículo líquido es un vehículo líquido farmacéuticamente aceptable, y el adenovirus es un vector adenoviral de transferencia de genes.

30 21. Un recipiente que comprende la composición líquida de cualquiera de las reivindicaciones 12-20.

22. El recipiente de la reivindicación 21, en el que el recipiente es de plástico.

23. El recipiente de la reivindicación 21, en el que el recipiente es de vidrio.