



República Federativa do Brasil  
Ministério da Economia  
Instituto Nacional da Propriedade Industrial

(21) BR 112019015245-8 A2



(22) Data do Depósito: 25/01/2018

(43) Data da Publicação Nacional: 14/04/2020

(54) **Título:** COMPOSIÇÃO, KIT, MISTURA AQUOSA, E, MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO.

(51) **Int. Cl.:** A61K 9/00; A61K 47/26; A61K 9/08; A61K 9/19; A61K 48/00.

(30) **Prioridade Unionista:** 25/01/2017 GB 1701239.4.

(71) **Depositante(es):** GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A..

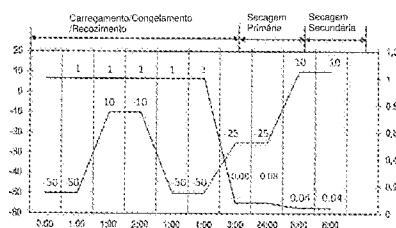
(72) **Inventor(es):** ERWAN BOURLES; OLIVIER DESPAS; DELPHINE GUILLAUME; FRÉDÉRIC MATHOT; MATHIEU VASSELLE.

(86) **Pedido PCT:** PCT IB2018050453 de 25/01/2018

(87) **Publicação PCT:** WO 2018/138667 de 02/08/2018

(85) **Data da Fase Nacional:** 24/07/2019

(57) **Resumo:** A presente invenção refere-se à formulação de vetores adenovirais em composições contendo sorbitol em combinação com um outro açúcar amorfo, à sua formulação, e, também, a um método para obtenção de uma composição seca.



## COMPOSIÇÃO, KIT, MISTURA AQUOSA, E, MÉTODO PARA PREPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO

[001] A presente invenção refere-se à formulação de vetores adenovirais em composições secadas por congelamento, às suas formulações e também aos métodos para obtenção da composição secada por congelamento.

### ANTECEDENTES

[002] Os vetores adenovirais representam uma plataforma de distribuição de proteína profilática ou terapêutica pela qual a sequência de ácido nucleico codificante da proteína profilática ou terapêutica é incorporada no genoma adenoviral, que é expressada quando a partícula adenoviral é administrada ao sujeito tratado. Tem sido um desafio na técnica o desenvolvimento de formulações estabilizadas para os vetores adenovirais que permitem armazenamento em temperaturas de armazenamento aceitáveis com um prazo de validade considerável.

[003] Formulações estabilizadas têm sido relatadas para vetores adenovirais humanos como descrito por R.K Evans *et al.* ('Development of stable Liquid Formulations for Adenovirus-Based Vaccines' *Journal of Pharmaceutical Sciences* (2004) Vol. 93, No. 10, 2458-2475). Entretanto, permanece uma necessidade na técnica de formulações que preservam a estabilidade de vetores adenovirais.

### SUMÁRIO DA INVENÇÃO

[004] Os inventores surpreendentemente descobriram que o uso de sorbitol na formulação de vetores adenovirais simianos melhora substancialmente a estabilidade durante toda a liofilização, especialmente em combinação com o açúcar amorfo trealose como um crioprotetor adicional. A invenção portanto provê uma mistura aquosa para liofilização e uma composição secada por congelamento obtida da dita mistura aquosa por liofilização (doravante referida como a "composição secada") compreendendo

sorbitol em combinação com um outro açúcar amorfo que atua como um crioprotetor, como trealose.

[005] Além disso, tem sido descoberto que o baixo teor de sal tem efeitos adicionalmente favoráveis sobre a estabilidade das partículas de vetores adenovirais simianos, especialmente sobre a estabilidade durante a secagem por congelamento e sob reconstituição do bolo liofilizado. Dessa forma, a invenção provê, ainda, as composições adenovirais contendo sorbitol e um outro açúcar amorfo também compreendendo uma quantidade baixa de NaCl. A invenção também provê um método de uso da composição secada por congelamento pelo qual a composição é reconstituída com um líquido aquoso baixo em sal, por exemplo água para injeção ou uma solução aquosa de um agente isotonicante não iônico.

[006] A invenção provê, ainda, um método de liofilização das composições de vetor adenoviral descritas.

#### DESCRIÇÃO BREVE DOS DESENHOS

[007] Figura 1 – ilustração do ciclo de secagem por congelamento usado no Exemplo 1.

[008] Figura 2 – temperaturas de transição vítrea (T<sub>g</sub>) conforme determinadas para a composição testada no Exemplo 1: (1) composição compreendendo trealose 23%, (2) composição compreendendo sacarose 23%, (3) composição compreendendo trealose 23% + sorbitol 2%, (4) composição compreendendo sacarose 23% + sorbitol 2%.

[009] Figura 3 – infectividade das adenopartículas contidas nas composições conforme obtidas no Exemplo 1: (1) trealose 23% (designada por (+)), (2) sacarose 23% (designada por X), (3) trealose 23% + sorbitol 2% (designada por (Y)), (4) sacarose 23% + sorbitol 2% (designada por (Z)) e (5) Controle *bulk* purificado fresco (designado por triângulo não invertido) e (6) controle *bulk* purificado degradado (designado por triângulo invertido).

[0010] Figura 4 – ilustração do ciclo de secagem por congelamento

conforme usado no Exemplo 2.

[0011] Figura 5 – Tg conforme determinada no Exemplo 2.

[0012] Figura 6 – teor de umidade conforme determinado no Exemplo 2.

[0013] Figura 7 – osmolalidade conforme determinada no Exemplo 2.

[0014] Figura 8 – dados do ensaio PicoGreen® conforme determinados no Exemplo 2.

[0015] Figura 9 – infectividade conforme determinada no Exemplo 2.

[0016] Figura 10 – recuperação por cromatografia líquida de ultraeficiência (UPLC, *Ultra-Performance Liquid Chromatography*) determinada no Exemplo 2.

[0017] Figura 11 – ilustração da análise estatística dos dados com respeito aos diferentes parâmetros conforme determinados no Exemplo 2 para identificar combinações otimizadas (representação gráfica 1 de design de experimentos (DOE, *Design Of Experiments*)).

[0018] Figura 12 – ilustração da análise estatística dos dados com respeito aos diferentes parâmetros conforme determinados no Exemplo 2 para identificar combinações otimizadas nas quais são permitidas concentrações mais altas de trealose (representação gráfica 2 de DOE).

[0019] Figura 13 – ciclo de secagem por congelamento 1 conforme usado no Exemplo 3.

[0020] Figura 14 – ciclo de secagem por congelamento 2 conforme usado no Exemplo 3.

[0021] Figura 15 – dados do ensaio PicoGreen® conforme determinados no Exemplo 3: (x) pontos de dados para as amostras obtidas usando a condição de secagem por congelamento com dessecação secundária a +10°C (ciclo de liofilização (2)), (+) pontos de dados para as amostras obtidas usando a condição de secagem por congelamento com dessecação secundária a +25°C (ciclo de liofilização (1)), (triângulo não invertido) -

estoque adenoviral de controle, (triângulo invertido) - estoque adenoviral degradado de controle negativo.

[0022] Figura 16 – dados de infectividade conforme determinados no Exemplo 3: (x) pontos de dados para as amostras obtidas usando uma condição de secagem por congelamento com dessecação secundária a +10°C, (+) pontos de dados para as amostras obtidas usando uma condição de secagem por congelamento com dessecação secundária a +25°C, (triângulo não invertido) - estoque adenoviral de controle, (triângulo invertido) - estoque adenoviral degradado de controle negativo.

[0023] Figura 17 – dados de UPLC conforme determinados no Exemplo 3: (x) pontos de dados para as amostras obtidas usando uma condição de secagem por congelamento com dessecação secundária a +10°C, (+) pontos de dados para as amostras obtidas usando uma condição de secagem por congelamento com dessecação secundária a +25°C, (triângulo não invertido) - estoque adenoviral de controle, (triângulo invertido) - estoque adenoviral degradado de controle negativo.

[0024] Figura 18 – estabilidade de adenovírus simiano conforme determinada por estimativas de perda devido à secagem por congelamento; comparação de trealose 18% + sorbitol 3,5% com trealose 23% em temperaturas de secagem secundárias de 15°C e 25°C.

[0025] Figura 19 – diagrama de dispersão demonstrando a estabilidade de trealose 18% + sorbitol 3,5% e trealose 23% em temperaturas de secagem de 15°C e 25°C durante 200 dias.

[0026] Figura 20 – aspecto de adenovírus liofilizado formulado com 18% de trealose + 3,5% de sorbitol (painéis esquerdos) ou 23% de trealose (painéis direitos) em temperaturas de secagem secundárias de 15°C ou 25°C após simulação de transporte rodoviário de duas horas e de transporte aéreo de duas horas. Os frascos foram quer siliconizados (S+) quer não siliconizados (S-). Os frascos siliconizados foram carregados com um

excedente de 50% e os frascos não siliconizados foram carregados com um excedente de quer 50% quer 100%. (O) = aspecto intacto; (+) = aspecto rachado; (X) = aspecto fragmentado.

[0027] Figura 21 – consistência de adenovírus liofilizado formulado com 18% de trealose + 3,5% de sorbitol (painéis esquerdos) ou 23% de trealose (painéis direitos) em temperaturas de secagem secundárias de 15°C ou 25°C após simulação de transporte rodoviário de duas horas e de transporte aéreo de duas horas. Os frascos foram quer siliconizados (S+) quer não siliconizados (S-). Os frascos siliconizados foram carregados com um excedente de 50% e os frascos não siliconizados foram carregados com um excedente de quer 50% quer 100%. (O) = consistência não pulverulenta; (+) = consistência muito pouco pulverulenta; (X) = consistência muito pulverulenta.

#### DESCRIÇÃO DETALHADA

[0028] Ao contrário dos relatórios na técnica sobre a formulação de vetores adenovirais, os inventores descobriram que formulações estáveis desenvolvidas para por exemplo vetores adenovirais humanos puderam ser aplicadas com sucesso para todos os vetores adenovirais, por exemplo vetores adenovirais simianos. A presente invenção descreve agora as composições de vetores adenovirais nas quais a funcionalidade e integridade estrutural de partículas adenovirais são melhor protegidas ou mantidas.

[0029] Os inventores descobriram que a adição de sorbitol em combinação com um outro açúcar amorfo quando se formulam vetores adenovirais, e em particular vetores adenovirais simianos, para secagem por congelamento, aumenta a estabilidade daquele vetor adenoviral sob secagem por congelamento e/ou durante armazenamento adicional.

[0030] Tanto sorbitol quanto o outro açúcar amorfo são considerados como crioprotetores. O termo “crioprotetor” refere-se a uma classe de excipientes que previnem o dano por congelamento do que está sendo congelado, *in casu*, o vetor adenoviral.

[0031] Um açúcar amorfo adequado para uso de acordo com a presente invenção em combinação com sorbitol pode ser selecionado dentre sacarose, trealose, manose, manitol, rafinose, lactitol, ácido lactobiônico, glicose, maltulose, iso-maltulose, lactulose, maltose, lactose, isomaltose, maltitol, palatinit®, estaquiase, melezitose, dextrana, ou uma combinação dos(as) mesmos(as). Em uma modalidade, o açúcar amorfo é selecionado dentre sacarose, trealose, lactose, rafinose, dextrana e combinações das mesmas.

[0032] Em uma modalidade específica, o outro açúcar amorfo em combinação com sorbitol é trealose ou sacarose, ou, trealose em combinação com um segundo açúcar amorfo como selecionado dentre sacarose, lactose, rafinose, dextrana e manitol. Alternativamente, o açúcar amorfo é trealose, sacarose ou combinação de sacarose e trealose. Em outra modalidade, o açúcar amorfo é trealose ou trealose em combinação com sacarose. Em ainda outra modalidade, o açúcar amorfo é trealose.

[0033] Sorbitol e o açúcar amorfo selecionado, por exemplo trealose, podem estar presentes em uma razão definida. Em uma modalidade, a razão entre sorbitol e açúcar amorfo é 4/10 ou abaixo, 4/12 ou abaixo, 4/13 ou abaixo, 4/14 ou abaixo. Em outra modalidade, a razão entre sorbitol e açúcar amorfo está entre 4/10 e 3/23, entre 4/12 e 4/23, entre, 4/13 e 4/20, entre 4/14 e 4/18, entre 4/14 e 3,5/16, ou entre 4/14 e 4/16. Em uma modalidade específica a razão está entre 4/14 e 4/16. Em uma outra modalidade específica, o açúcar amorfo é trealose e a razão entre sorbitol e trealose está entre 4/14 e 4/16.

[0034] Sorbitol pode estar presente em quantidades definidas na mistura aquosa da qual a composição é secada por congelamento. Em uma modalidade, a mistura aquosa contém entre 2 e 4% (p/v), entre 2,5 e 4% (p/v) ou entre 3 e 4% (p/v) de sorbitol. Em uma modalidade específica, sorbitol está presente em uma quantidade entre 3 e 4% (m/v).

[0035] O açúcar amorfo conforme selecionado de acordo com as modalidades da presente invenção pode estar presente em quantidades definidas. Em uma modalidade, a mistura aquosa contém pelo menos 3% (p/v), pelo menos 5% (p/v), pelo menos 10% (p/v), pelo menos 11% (p/v), pelo menos 12% (p/v), pelo menos 13% (p/v), ou pelo menos 14% (p/v) do açúcar amorfo conforme selecionado, acima, na presente invenção. Em outra modalidade açúcar amorfo selecionado está presente na mistura aquosa em uma quantidade total de menos que 23% (p/v), como menos que 20% (p/v), menos que 18% (p/v), menos que 17% (p/v), menos que 16% (p/v), ou menos que 15% (p/v). Alternativamente dito, o açúcar amorfo está presente na mistura aquosa em uma quantidade total de 23% ou menos (p/v), como 20% ou menos (p/v), 18% ou menos (p/v), 17% ou menos (p/v), 16% ou menos (p/v), ou 15% ou menos (p/v). Alternativamente dito, o açúcar amorfo pode estar presente na mistura aquosa em uma quantidade total de pelo menos 12%, pelo menos 13% ou pelo menos 14% (p/v), mas menos que 18%, menos que 17%, ou menos que 16% (p/v).

[0036] Em uma modalidade específica, o açúcar amorfo é trealose e está presente em uma quantidade entre 12% e 18% (p/v), ou, entre 14% e 16,5% (p/v).

[0037] Os inventores descobriram, adicionalmente, que os vetores adenovirais podem ser substancialmente afetados pela presença de sal, como cloreto de sódio, quer quando em forma seca quer quando em forma líquida. A invenção portanto refere-se, adicionalmente, às formulações, isto é misturas aquosas para liofilização e composições secadas conforme descritas na presente invenção, considerando-se a sensibilidade de vetores adenovirais ao sal, como cloreto de sódio. Em uma modalidade, vetores adenovirais simianos são formulados usando as misturas aquosas e composições secadas conforme descritas na presente invenção.

[0038] O termo “sal”, como usado na presente invenção, refere-se aos



compostos iônicos que resultam da reação de neutralização de um ácido e uma base, compostos de um número relacionado de cátions e ânions de modo que o produto seja sem carga líquida, por exemplo, cloreto de sódio. Os íons componentes podem ser quer inorgânicos quer orgânicos, e, podem ser monoatômicos ou poliatômicos.

[0039] De acordo com uma modalidade, a quantidade de sal, em particular a quantidade de NaCl, presente na mistura aquosa, é definida como sendo menos que 50 mM, menos que 40 mM, menos que 30 mM, menos que 20 mM, menos que 15 mM, menos que 10 mM, ou, menos que 7,5 mM. Alternativamente dito, a quantidade de NaCl, presente na mistura aquosa pode ser definida como sendo de 50 mM ou menos, 40 mM ou menos, 30 mM ou menos, 20 mM ou menos, 15 mM ou menos, 10 mM ou menos, ou, 7,5 mM ou menos. Preferivelmente a composição não está completamente destituída de sal ou não está completamente destituída de NaCl. Para evitação de dúvida concernente a cada uma das modalidades relacionadas ao teor de sal e ao teor de NaCl em particular, é entendido que o sal, respectivamente NaCl, está presente em uma quantidade mensurável. Portanto de acordo com uma modalidade da invenção, o sal, em particular cloreto de sódio, está presente em uma quantidade de pelo menos 0,5 mM, pelo menos 1 mM, pelo menos 2 mM, pelo menos 3 mM, ou, pelo menos 4 mM. Alternativamente, cloreto de sódio está presente em uma quantidade entre 1 e 50 mM, entre 2,5 e 25 mM, entre 2,5 e 15 mM, entre 2,5 e 10 mM ou entre 2,5 e 7,5 mM. De acordo com uma modalidade específica, cloreto de sódio está presente em uma quantidade de cerca de 5 mM, por exemplo  $5\text{ mM} \pm 0,5\text{ mM}$ .

[0040] Para o propósito de definição das faixas numéricas, o termo “entre”, como usado na presente invenção, é considerado para incluir os valores numéricos de extremidade da faixa. Por exemplo, quando é dito que cloreto de sódio está presente em uma quantidade entre 2,5 e 10 mM, estão incluídas aquelas formulações nas quais NaCl está presente em uma

concentração de 2,5 mM ou de 10 mM.

[0041] De acordo com outras modalidades, também é definido o teor de sal, como o teor de cloreto de sódio, do diluente ou líquido aquoso para reconstituição da composição secada. Por reconstituição de uma composição secada por congelamento quer-se dizer a reidratação da composição secada para obter, de novo, uma mistura líquida. De acordo com uma modalidade a quantidade de sal, por exemplo de cloreto de sódio, presente no líquido aquoso para reconstituição é menos que 50 mM, menos que 40 mM, menos que 30 mM, menos que 20 mM, menos que 15 mM, menos que 10 mM, ou, menos que 7,5 mM, 50 mM ou menos, 40 mM ou menos, 30 mM ou menos, 20 mM ou menos, 15 mM ou menos, 10 mM ou menos ou 7,5 mM ou menos.

[0042] O líquido aquoso para reconstituição da composição liofilizada pode estar essencialmente isento de sal, como essencialmente isento de cloreto de sódio. Por essencialmente isento quer-se dizer que a concentração de sal ou de cloreto de sódio é zero mM ou está muito próxima de zero mM. Em uma modalidade específica, a composição secada por congelamento pode ser reconstituída com água para injeção (API).

[0043] Em uma outra modalidade, o líquido aquoso para reconstrução da composição não está completamente destituído de sal ou de cloreto de sódio. Consequentemente, o sal, como cloreto de sódio, pode estar presente no líquido aquoso usado para reconstituição da composição secada em uma quantidade de pelo menos 0,5 mM, pelo menos 1 mM, pelo menos 2 mM, pelo menos 3 mM, ou, pelo menos 4 mM. Alternativamente, o sal, como cloreto de sódio, está presente no líquido aquoso usado para reconstituição da composição em uma quantidade entre 1 e 50 mM, entre 2,5 e 25 mM, entre 2,5 e 15 mM, entre 2,5 e 10 mM ou entre 2,5 e 7,5 mM. De acordo com uma modalidade específica, o sal, como cloreto de sódio, está presente no líquido aquoso usado para reconstituição da composição em uma quantidade de 5 mM.

[0044] A invenção, portanto, também provê um método de uso da composição secada conforme descrito na presente invenção, em que a composição secada é reconstituída com um líquido aquoso para reconstituição da composição conforme definida na presente invenção.

[0045] A mistura aquosa ou composição secada de incluir, ainda, um tensoativo selecionado dentre tensoativos poloxâmero (por exemplo poloxâmero 188), tensoativos polissorbato (por exemplo polissorbato 80 e/ou polissorbato 20), tensoativos octoxinal, tensoativos polidocanol, tensoativos polioxil-estearato, tensoativos polioxil-óleo-de-rícino, tensoativos N-octil-glicosídeo, macrogol-15-hidroxi-estearato, e combinações dos mesmos. Em uma modalidade, o tensoativo é selecionado dentre tensoativos poloxâmero (por exemplo poloxâmero 188), tensoativos polissorbato (por exemplo polissorbato 80 e/ou polissorbato 20), em particular tensoativos polissorbato como polissorbato 80.

[0046] Em uma modalidade, o tensoativo está presente em uma quantidade de pelo menos 0,001%, pelo menos 0,005%, pelo menos 0,01% (p/v), e/ou até 0,5% (p/v) conforme calculada com respeito à mistura aquosa. O tensoativo pode estar presente em uma quantidade menor que 0,25% ou menor que 0,1% (p/v). Em outra modalidade, o tensoativo está presente em uma quantidade de 0,02% (p/v).

[0047] De acordo com modalidades específicas, o tensoativo é polissorbato 80 ou poloxâmero 188 presente na mistura aquosa em uma quantidade entre 0,005% e 0,5% (p/v), como cerca de 0,02% (p/v).

[0048] Em uma outra modalidade, um agente tamponante é adicionado à mistura aquosa ou à composição secada. O pH é tipicamente ajustado considerando-se os componentes terapêuticos da composição. Adequadamente, o pH da mistura aquosa é pelo menos 6, pelo menos 6,5, pelo menos 7 ou pelo menos 7,5. Alternativamente dito, o pH da mistura aquosa pode ser menor que 10, menor que 9,5, menor que 9 ou menor que 8,5.

Em outras modalidades, o pH da mistura aquosa está entre 6 e 10, entre 7 e 9,5, entre 7,5 e 9,5, ou, é cerca de 7,5, por exemplo  $7,5 \pm 0,5$ , ou,  $8,5 \pm 0,5$ . O pH ótimo é também, em parte, determinado pelo vetor adenoviral específico formulado e/ou pelo transgene incorporado no mesmo.

[0049] Um agente tamponante apropriado pode ser selecionado dentre Tris (“tris(hidroximetil)aminometano”), succinato, borato, Tris-maleato, lisina, histidina, glicina, glicilglicina, citrato, carbonato, fosfato ou combinações dos mesmos. Em uma modalidade, o agente tamponante é Tris, succinato ou borato. Em uma outra modalidade, o agente tamponante é Tris.

[0050] O agente tamponante pode estar presente na mistura aquosa em uma quantidade de pelo menos 0,5 mM, pelo menos 1 mM, pelo menos 2 mM ou pelo menos 5 mM. Ou, o agente tamponante pode estar presente na mistura aquosa em uma quantidade de menos que 50 mM, menos que 40 mM, menos que 30 mM ou menos que 20 mM. Por exemplo, o agente tamponante pode estar presente em uma quantidade de 0,5 mM a 50 mM, 1 mM a 50 mM ou 2 mM a 20 mM. Em uma modalidade, o agente tamponante está presente em uma quantidade de cerca de 10 mM.

[0051] De acordo com modalidades específicas, o agente tamponante é Tris, presente na mistura aquosa em uma quantidade entre 2 e 20 mM, como a cerca de 10 mM.

[0052] Em uma modalidade, a composição também compreende histidina em uma quantidade de até ou cerca de 20 mM, como em uma concentração de cerca de 10 mM.

[0053] De acordo com outras modalidades, a composição também compreende íons de metal bivalente, como  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ , ou  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$  na forma de um sal, como  $MgCl_2$ ,  $CaCl_2$  ou  $MgSO_4$ . Em uma modalidade o íon de metal bivalente é  $Mg^{2+}$ . Quantidades típica nas quais os íons de metal bivalente estão presentes na mistura aquosa estão entre 0,5 e 10 mM, como 1 ou 2 mM, ou 1 mM em particular.

[0054] Para o propósito de descrever as modalidades da invenção e afastar qualquer indicação em contrário, as quantidades especificadas de excipientes considerados para inclusão na composição (isto é sal, cloreto de sódio, crioprotetor, agente tamponante, tensoativo e outros descritos na presente invenção) são tipicamente (e salvo indicação em contrário) expressadas como %p/v calculada com respeito ao volume da mistura aquosa. Alternativamente, no caso de a mistura aquosa ser secada por congelamento e reconstituída, a quantidade de excipientes pode ser expressada como %p/v calculada com relação ao volume da composição reconstituída.

[0055] Adicionalmente à estabilidade aumentada durante o processo de secagem por congelamento, a formulação nova pode também aumentar a estabilidade do vetor adenoviral durante armazenamento da composição secada por congelamento. A formulação nova permite o armazenamento da composição, líquida ou secada, a 4°C, 25°C ou 37°C, durante até 1 mês, 3 meses, 6 meses, 1 ano, 2 anos ou 3 anos. Em uma modalidade, a composição secada pode ser armazenada a 4°C durante 3 anos, a 25°C durante 3 meses ou a 37°C durante 1 mês. É entendido que o armazenamento é adequado se pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou pelo menos 90% da infectividade é retida comparada com a infectividade do material de partida.

[0056] As misturas, composições e métodos, descritos na presente invenção, permitem o armazenamento do vetor adenoviral durante pelo menos 1 mês a 37°C, ou pelo menos 3 meses a 25°C ou pelo menos 3 anos a 4°C enquanto que retêm pelo menos 50%, pelo menos 60%, pelo menos 70%, pelo menos 80% ou pelo menos 90% da infectividade em comparação com a infectividade do material de partida.

[0057] A estabilidade dos vetores adenovirais pode, dentre outros métodos, ser determinada pela medição da infectividade do vetor, por exemplo retenção de infectividade durante manipulação (por exemplo

secagem por congelamento) ou armazenamento do vetor viral. O termo “infectividade” refere-se à capacidade do vetor para entrar em um hospedeiro suscetível, isto é células, e liberar seu material genético para expressão pelo hospedeiro. A infectividade pode ser expressada como “a dose 50% infecciosa em cultura celular” (CCID50, *50% Cell Culture Infectious Dose*), que é a quantidade de vetor adenoviral que é necessária para infectar 50% das células em uma dada cultura celular. A infectividade pode ser medida pela medição da proporção de células nas quais o transgene adenoviral é expressado. Por exemplo, proteína fluorescente verde pode ser usada como um marcador de infectividade pela qual é determinado o número de células expressoras de proteína fluorescente verde após 24 horas de incubação com o vetor. Alternativamente, a infectividade pode ser medida pela determinação do número de células expressoras da proteína capsídica hexon de adenovírus após 24 horas de incubação com o vetor.

[0058] Adenovírus tem sido amplamente usado para aplicações de transferência de gene devido à capacidade deles para realizar transferência de gene elevadamente eficiente em uma variedade de tecidos-alvo e grande capacidade transgênica. Os vetores adenovirais de uso na presente invenção podem ser derivados de uma variedade de hospedeiros mamíferos. Têm sido isolados mais de 100 sorotipos diferentes de adenovírus que infectam várias espécies de mamífero. Estes sorotipos adenovirais têm sido categorizados em seis subgêneros (A F; B é subdividido em B1 e B2) de acordo com a homologia de sequência e a capacidade deles de aglutinarem células vermelhas do sangue (Tatsis e Ertl, *Molecular Therapy* (2004) 10:616–629).

[0059] Em uma modalidade, o vetor adenoviral da presente invenção é derivado de um adenovírus humano. Exemplos de adenovírus derivados de humano são Ad1, Ad2, Ad4, Ad5, Ad6, Ad11, Ad 24, Ad34, Ad35, particularmente Ad5, Ad11 e Ad35. Embora os vetores baseados em Ad5 tenham sido usados extensivamente em números testes de terapia gênica,

pode haver limitações sobre o uso de Ad5 e de outros vetores adenovirais humanos do grupo C devido à imunidade pré-existente na população geral por causa de infecção natural. Ad5 e outros membros de vetores adenovirais humanos do grupo C tendem a ser dentre os sorotipos mais soroprevalentes. Adicionalmente, a imunidade aos vetores existentes pode desenvolver-se como resultado da exposição ao vetor durante o tratamento. Estes tipos de imunidade pré-existente ou desenvolvida aos vetores soroprevalentes pode limitar a efetividade da terapia gênica ou dos esforços de vacinação. Sorotipos adenovirais alternativos, por conseguinte, constituem alvos muito importantes na busca de sistemas de distribuição gênica capazes de evadir a resposta imune do hospedeiro.

[0060] Portanto, em outra modalidade, o vetor adenoviral da presente invenção é derivado de um adenovírus simiano não humano, também referido simplesmente como um adenovírus simiano. Numerosos adenovírus têm sido isolados de simianos não humanos como chimpanzés, bonobos, macacos *Rhesus* e gorilas, e vetores derivados destes adenovírus induzem fortes respostas imunes aos transgenes codificados por estes vetores (Colloca *et al.* (2012) *Sci. Transl. Med.* 4:1-9; Roy *et al.* (2004) *Virol.* 324: 361-372; Roy *et al.* (2010) *J. Gene Med.* 13:17-25). Determinadas vantagens de vetores baseados em adenovírus simianos não humanos incluem a falta relativa de anticorpos neutralizantes cruzados para estes adenovírus na população-alvo. Por exemplo, a reação cruzada de determinados adenovírus de chimpanzé com respostas de anticorpos neutralizantes pré-existentes está presente apenas em 2% da população-alvo comparada com 35% no caso de determinados vetores adenovirais humanos candidatos.

[0061] Em modalidades específicas, o vetor adenoviral é derivado de um adenovírus não humano, como um adenovírus simiano e em particular um adenovírus de chimpanzé como ChAd3, ChAd63, ChAd83, ChAd155, ChAd157, Pan 5, Pan 6, Pan 7 (também referido como C7) ou Pan 9.

Exemplos de tais cepas são descritas em WO03/000283, WO2010/086189 e GB1510357.5 e estão também disponíveis junto à “American Type Culture Collection”, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EUA, e outros fornecedores. Alternativamente, vetores adenovirais podem ser derivados de adenovírus simianos não humanos isolados de bonobos, como PanAd1, PanAd2 ou PanAd3. Exemplos de tais vetores descritos na presente invenção podem ser encontrados, por exemplo, em WO2005/071093 e WO2010/086189. Vetores adenovirais podem também ser derivados de adenovírus isolados de gorilas conforme descrito em WO2013/52799, WO2013/52811 e WO2013/52832.

[0062] Adenovírus têm uma morfologia característica com um capsídeo icosaédrico compreendendo três proteínas majoritárias, proteína *hexon* (hexamérica) (II), proteína *penton-base* (pentamérica) (III) e uma proteína *knobbed fiber* (fibra com região globular) (IV), juntamente com numerosas outras proteínas minoritárias, VI, VIII, IX, IIIa e IVa2. A proteína *hexon* (hexamérica) totaliza a maioria dos componentes estruturais do capsídeo, que consiste em 240 capsômeros *hexon* (hexaméricos) triméricos e 12 *penton-bases* (bases pentaméricas). A proteína *hexon* tem três barris duplos conservados, enquanto que o topo tem três torres, cada torre contendo uma alça de cada subunidade que forma a maior parte do capsídeo. A base da proteína *hexon* está elevadamente conservada entre os sorotipos adenovirais, enquanto que as alças da superfície são variáveis (Tatsis e Ertl, *Molecular Therapy* (2004) 10:616–629). *Penton* é outra proteína capsídica adenoviral que forma uma base pentamérica à qual a fibra se liga. A proteína fibra trimérica projeta-se a partir da *penton-base* em cada um dos 12 vértices do capsídeo e é uma estrutura do tipo haste com região globular. A função principal da proteína fibra é a ancoragem do capsídeo viral na superfície celular via a interação da região globular com um receptor celular, e variações na haste flexível e também nas regiões globulares da fibra são características



dos diferentes sorotipos (Nicklin *et al. Molecular Therapy* 2005 12:384–393).

[0063] Vetores adenovirais podem ser usados para liberar sequências de proteína ou de RNA desejadas, por exemplo sequências heterólogas, para expressão *in vivo*. Um vetor pode incluir qualquer elemento genético incluindo DNA nu, um fago, transposon, cosmídeo, epissoma, plasmídeo, ou um vírus. Por “cassete de expressão” (ou “minigene”) quer-se dizer a combinação de um gene heterólogo (transgene) selecionado e outros elementos regulatórios necessários para conduzir tradução, transcrição e/ou expressão do produto gênico em uma célula hospedeira.

[0064] Tipicamente, um vetor adenoviral é planejado de modo que o cassete de expressão esteja localizado em uma molécula de ácido nucleico que contém outras sequências adenovirais na região nativa a um gene adenoviral selecionada. O cassete de expressão pode ser inserido em uma região gênica existente para inativar a função daquela região, se desejado. Alternativamente, o cassete de expressão pode ser inserido no sítio de um gene adenoviral parcial ou completamente deletado. Por exemplo, o cassete de expressão pode estar localizado no sítio de uma mutação, inserção ou deleção que torna não funcional pelo menos um gene de uma região genômica selecionada do grupo consistindo em E1A, E1B, E2A, E2B, E3 e E4. O termo “torna não funcional” significa que uma quantidade suficiente da região gênica é removida ou diferentemente inativada, de modo que a região gênica não é mais capaz de produzir produtos funcionais da expressão do gene. Se desejado, a região gênica inteira pode ser removida (e adequadamente substituída pelo cassete de expressão). Adequadamente, genes E1 de adenovírus são deletados e substituídos por um cassete de expressão consistindo no promotor escolhido, sequência de cDNA do gene de interesse e um sinal poli-A, resultando em um vírus recombinante defectivo em replicação.

[0065] Em uma modalidade, o transgene codificado pelo vetor

adenoviral é uma sequência codificante de um produto que é útil em biologia e medicina, como proteínas terapêuticas ou imunogênicas, RNA, enzimas, ou RNAs catalíticos. Moléculas de RNA desejáveis incluem tRNA, dsRNA, RNA ribossômico, RNAs catalíticos, aptâmeros de RNA, e RNAs antissenso. Um exemplo de uma sequência de RNA útil é uma sequência que extingue a expressão de uma sequência de ácido nucleico selecionada no animal tratado.

[0066] Dessa forma, em uma modalidade, a mistura ou composição conforme descrita na presente invenção é para uso em tratamento profilático (portanto, imunogênico ou preventivo) ou terapêutico de um sujeito, como um sujeito mamífero ou humano, dependendo do transgene codificado pelo vetor adenoviral.

[0067] O transgene pode codificar um polipeptídeo ou uma proteína usado(a) para tratamento, por exemplo, de deficiências genéticas, como uma vacina ou um agente terapêutico contra câncer, para indução de uma resposta imune, e/ou para propósitos de vacina profilática. Como usada na presente invenção, indução de uma resposta imune refere-se à capacidade de uma proteína, também conhecida como um “antígeno” ou “imunógeno”, para induzir uma resposta imune humoral e/ou de célula-T à proteína.

[0068] Os imunógenos expressados pelos vetores adenovirais formulados conforme descritos na presente invenção e que são úteis para imunizar um ser humano ou um animal não humano contra outros patógenos incluem, por exemplo, bactérias, fungos, micro-organismos parasitas ou parasitas multicelulares que infectam vertebrados humanos e não humanos, ou contra uma célula cancerosa ou uma célula tumoral. Por exemplo, os imunógenos podem ser selecionados de uma variedade de famílias virais.

[0069] Em uma modalidade, o imunógeno é de um filovírus, por exemplo Ebola (espécies Zaire, Sudão, Reston, Budibugyo e Costa do Marfim) ou Marburg. Tais antígenos podem ser derivados da glicoproteína viral (transmembrana e/ou forma secretada) e/ou da nucleoproteína viral.

Exemplos de tais vetores podem ser encontrados, *inter alia*, em WO2011/130627.

[0070] Em outra modalidade, imunógenos podem ser selecionados dentre vírus respiratório como vírus sincicial respiratório (RSV, *Respiratory Syncytial Virus*) e outros paramixovírus como metapneumovírus humano, hMPV e vírus da parainfluenza (PIV, *Parainfluenza Virus*). Os antígenos adequados de RSV que são úteis como imunógenos para imunizar um ser humano ou um animal não humano podem ser selecionados dentre: a proteína de fusão (F), a proteína de ligação (G), a proteína de matriz (M2) e a nucleoproteína (N). Tais vetores são descritos em WO2012/089833 e PCT/EP2016/063297. Em uma modalidade, o constructo ChAd155-RSV, conforme revelado em PCT/EP2016/063297, é considerado para as composições e os métodos revelados.

[0071] Em outra modalidade, o imunógeno pode ser de um retrovírus, por exemplo um lentivírus como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, *Human Immunodeficiency Virus*). Em uma tal modalidade, os imunógenos podem ser derivados das sequências de HIV-1 ou HIV-2, como para Gag, Pol, Nef, Env, e outras. Tais vetores são descritos, *inter alia*, em GB1510357.5 e WO2008/107370.

[0072] Em outra modalidade, o imunógeno pode ser de um Vírus do Papiloma Humano (HPV, *Human Papilloma Virus*). Em uma tal modalidade, os imunógenos podem ser derivados de qualquer tipo de HPV e em particular dos tipos de HPV que conhecidamente causam enfermidade ou doença, por exemplo tipos de HPV de alto risco causadores de cânceres urogenitais HPV16, HPV18 e semelhantes.

[0073] Alternativa ou adicionalmente, uma sequência de transgene pode incluir uma sequência repórter, que sob expressão produz um sinal detectável. Tais sequências repórter incluem, sem limitação, sequências de DNA codificantes de  $\beta$ -lactamase,  $\beta$ -galactosidase (LacZ), fosfatase alcalina,

timidina-quinase, proteína fluorescente verde (GFP, *Green Fluorescent Protein*), cloranfenicol-acetiltransferase (CAT), luciferase, proteínas ligadas à membrana incluindo, por exemplo, CD2, CD4, CD8, a proteína hemaglutinina da influenza, e outras bem conhecidas na técnica, que são reconhecidas por anticorpos de alta afinidade existentes ou que podem ser produzidos por meios convencionais, e proteínas de fusão compreendendo uma proteína ligada à membrana apropriadamente fusionada a um domínio de etiqueta antigênica (*antigen tag domain*) de, dentre outras, hemaglutinina ou Myc. Estas sequências condificantes, quando associadas com elementos regulatórios que conduzem a expressão delas, proveem sinais detectáveis por meios convencionais, incluído ensaios enzimáticos, radiográficos, colorimétricos, de fluorescência ou outros ensaios espectrográficos, ensaios de separação celular ativada por fluorescência e ensaios imunológicos, incluindo ensaio imunoabsorvente ligado à enzima (ELISA, *Enzyme Linked Immunosorbent Assay*), radioimunoensaio (RIA, *RadioImmunoAssay*) e imuno-histoquímica.

[0074] Adicionalmente ao transgene, o cassete de expressão também pode incluir elementos de controle convencionais que estão funcionalmente ligados ao transgene em uma maneira que permite suas transcrição, tradução e/ou expressão em uma célula transfectada com o vetor adenoviral. Como usadas na presente invenção, sequências “funcionalmente ligadas” incluem tanto sequências de controle de expressão que são contíguas com o gene de interesse quanto sequências de controle de expressão que atuam em *trans* ou a uma distância para controlar o gene de interesse.

[0075] As sequências de controle de expressão incluem as apropriadas sequências de iniciação de transcrição, de terminação de transcrição, de promotor e de intensificador; os sinais de processamento eficiente de RNA como sinais de encadeamento (*splicing*) e de poliadenilação (poli-A) incluindo poli-A (poliadenilação) de beta-globina de coelho; sequências que

estabilizam o mRNA citoplasmático; sequências que intensificam a eficiência de tradução (por exemplo, sequência consenso Kozak); sequências que intensificam a estabilidade de proteína; e quando desejadas, sequências que intensificam a secreção do produto codificado. Dentre outras sequências, podem ser usados íntrons quiméricos.

[0076] Um “promotor” é uma sequência de nucleotídeos que permite a ligação da RNA-polimerase e dirige a transcrição de um gene. Tipicamente, um promotor está localizado na região não codificante 5’ de um gene, proximal ao sítio de iniciação transcricional do gene. Elementos de sequência dentro de promotores que funcionam na iniciação da transcrição são, com frequência, distinguidos por sequências de nucleotídeo consenso. Exemplos de promotores incluem, mas não são limitados a, promotores de bactérias, leveduras, plantas, vírus, e mamíferos (incluindo humanos). Um grande número de sequências de controle de expressão, incluindo promotores, que são internas, nativas, constitutivas, induzíveis e/ou tecido-específicas, são conhecidas na técnica e podem ser utilizadas.

[0077] Vetores adenovirais são gerados pela modificação do adenovírus de tipo selvagem para expressar genes heterólogos (transgenes) e/ou deletar ou inativar sequências adenovirais indesejáveis. Vetores adenovirais podem também ter competência de replicação alterada. Por exemplo o vetor pode ser defectivo em replicação ou ter replicação limitada de modo que ele tem uma capacidade reduzida para se replicar em células não complementares, comparado com o vírus de tipo selvagem. Este pode ser produzido por mutação do vírus por exemplo por deleção de um gene envolvido em replicação, por exemplo deleção do gene E1a, E1b, E3 ou E4. Tais modificações são conhecidas pela pessoa versada e são descritas na técnica, por exemplo por Roy *et al.*, *Human Gene Therapy* 15:519-530, 2004; Colloca *et al.* (2012) *Sci. Transl. Med.* 4:1-9; Roy *et al.* (2004) *Virol.* 324: 361-372; ou WO 03/000283.

[0078] Estes vetores são gerados usando técnicas conhecidas por aquelas pessoas versadas na técnica. Tais técnicas incluem técnicas de clonagem convencionais de cDNA como aqueles descritas em textos, uso de sequências de oligonucleotídeos sobrepostas dos genomas de adenovírus, reação em cadeia da polimerase, e qualquer método conhecido que provê a sequência de nucleotídeos desejada. Métodos particularmente adequados incluem métodos de recombinação homóloga padrão como aqueles providos em Colloca *et al.* (2012) *Sci. Transl. Med.* 4:1-9; Roy *et al.* (2004) *Viol.* 324: 361-372; Roy *et al.* (2010) *J. Gene Med.* 13:17-25; e WO2010/085984 ou métodos de recombinação como descritos em Warming *et al. Nuc. Acids Res.* (2005) 33:e36.

[0079] Os vetores adenovirais podem ser produzidos em qualquer linhagem celular adequada na qual o vírus é capaz de replicação. Em particular, podem ser usadas linhagens celulares complementares que proveem os fatores faltantes do vetor viral que resultam em suas características de replicação prejudicadas (como E1). Sem limitação, uma tal linhagem celular pode ser células HeLa (Número de Acesso da ATCC de CCL 2), A549 (Número de Acesso da ATCC de CCL 185), HEK 293, KB (CCL 17), Detroit (por exemplo, Detroit 510, CCL 72) e WI-38 (CCL 75), dentre outras. Estas linhagens celulares estão todas disponíveis junto à “American Type Culture Collection”, 10801 University Boulevard, Manassas, Virginia 20110-2209, EUA. Outras linhagens celulares parentais adequadas podem ser obtidas de outras fontes, como células PER.C6™, conforme representadas pelas células depositadas sob o número de acesso 96022940 da ECACC, “European Collection of Animal Cell Cultures” (ECACC) no “Centre for Applied Microbiology and Research” (CAMR, Reino Unido) ou células Her 96 (Crucell).

[0080] Uma linhagem celular complementar particularmente é a linhagem celular Procell92. A linhagem celular Procell92 é baseada em

células HEK 293 que expressam os genes adenovirais E1, transfectadas com o repressor Tet sob o controle do promotor fosfoglicerato-quinase-1 humano (PGK, *PhosphoGlycerate Kinase-1*), e o gene de resistência a G418 (Vitelli *et al. PLOS One* (2013) 8(e55435):1-9). Procell92.S está adaptado para crescimento sob condições de suspensão e é também útil para produção de vetores adenovirais expressores de proteínas tóxicas ([www.okairos.com/e/inner.php?m=00084](http://www.okairos.com/e/inner.php?m=00084), último acesso em 13 de Abril de 2015).

#### *Dosagem e métodos de distribuição adenoviral*

[0081] Uma mistura ou composição conforme descrita na presente invenção pode compreender um ou mais vetores recombinantes capazes de indução de uma resposta imune, por exemplo uma resposta imune humoral (por exemplo, anticorpo) e/ou mediada por célula (por exemplo, uma célula-T citotóxica), contra um produto transgênico liberado pelo vetor após distribuição a um mamífero, adequadamente a um humano. Um adenovírus recombinante pode compreender (adequadamente em qualquer uma de suas deleções de gene) um gene codificante de um imunógeno desejado e pode, portanto, ser usado em uma vacina. O adenovírus recombinante pode ser usado como vacinas profiláticas ou terapêuticas contra qualquer patógeno para o qual o(s) antígeno(s) crucial(ais) para indução de uma resposta imune e capazes de limitar a disseminação do patógeno têm sido identificados e para o qual o cDNA está disponível.

[0082] Portanto, em uma modalidade, a mistura e/ou composição descrita na presente invenção é para uso em imunização de um sujeito, como um sujeito humano. Os níveis de imunidade do gene selecionado podem ser monitorados para determinar a necessidade, se houver, de imunizações reforçadoras. Após uma avaliação de títulos de anticorpo no soro, imunizações reforçadoras opcionais podem ser desejadas.

[0083] Em uma modalidade, a mistura aquosa e/ou composições

(secadas por congelamento), descritas na presente invenção, podem ser administradas a um mamífero, por exemplo um sujeito humano. Em particular, aquelas misturas ou composições compreendendo vetor adenoviral codificante de um transgene (isto é um vetor adenoviral recombinante) que é uma proteína terapêutica ou imunogênica são consideradas para formulação na mistura aquosa ou nas composições secadas por congelamento conforme descritas na presente invenção.

[0084] Opcionalmente, uma mistura ou composição da invenção pode ser formulada para conter outros componentes, incluindo, por exemplo, outro(s) imunógeno(s), por exemplo antígeno(s) polipeptídico(s), e/ou adjuvantes. Um tal adjuvante pode ser administrado a uma primovacina de DNA codificante de um antígeno para intensificar a resposta imune antígeno-específica comparada com a resposta imune gerada após a primeira exposição ao antígeno (*priming*) com uma vacina de DNA codificante de apenas o antígeno. Alternativamente, um tal adjuvante pode ser administrado com um antígeno polipeptídico que é administrado em um regime de administração envolvendo os vetores adenovirais da invenção.

[0085] Em algumas modalidades, a mistura ou composição, conforme descrita na presente invenção, é administrada a um sujeito por injeção intramuscular, administração intravaginal, injeção intravenosa, injeção intraperitoneal, injeção subcutânea, administração epicutânea, administração intradérmica, administração nasal ou administração oral.

[0086] Se o regime terapêutico envolve coadministração de um ou mais vetores adenovirais e/ou de um outro componente, estes podem ser coformulados (isto é na mesma mistura ou composição) ou cada um pode ser formulado em composições diferentes. Quando formulados separadamente, são favoravelmente administrados colocalmente no ou próximo do mesmo sítio. Por exemplo, os componentes podem ser administrados (por exemplo mediante uma via de administração selecionada dentre intramuscular,



transdérmica, intradérmica, subcutânea) no mesmo lado ou na mesma extremidade (administração “colateral”) ou nos lados opostos ou extremidades opostas (“administração contralateral”).

[0087] As dosagens do vetor viral dependerão principalmente de fatores como a condição sendo tratada, a idade, o peso e a saúde do paciente, e podem, por conseguinte, variar dentre os pacientes. Por exemplo, uma dosagem veterinária ou humana adulta terapeuticamente eficaz do vetor viral em geral contém  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^{15}$  partículas virais, como de  $1 \times 10^8$  a  $1 \times 10^{12}$  (por exemplo,  $1 \times 10^8$ ,  $5 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$ ,  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$ ,  $2,5 \times 10^{10}$ ,  $5 \times 10^{10}$ ,  $1 \times 10^{11}$ ,  $5 \times 10^{11}$ ,  $1 \times 10^{12}$  partículas virais). Alternativamente, um vetor viral pode ser administrado em uma dose que é tipicamente de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^{10}$  unidades formadoras de placas (UFP), como  $1 \times 10^5$  UFP,  $5 \times 10^5$  UFP,  $1 \times 10^6$  UFP,  $5 \times 10^6$  UFP,  $1 \times 10^7$  UFP,  $5 \times 10^7$  UFP,  $1 \times 10^8$  UFP,  $5 \times 10^8$  UFP,  $1 \times 10^9$  UFP,  $5 \times 10^9$  UFP, ou  $1 \times 10^{10}$  UFP. As dosagens variarão dependendo do tamanho do animal e da via de administração. Por exemplo, uma dosagem humana ou veterinária adequada (para um animal de cerca de 80 kg) para injeção intramuscular está na faixa de cerca de  $1 \times 10^9$  a cerca de  $5 \times 10^{12}$  partículas virais por mL, para um sítio único. Opcionalmente, sítios múltiplos de administração podem ser usados. Em outro exemplo, uma dosagem humana ou veterinária adequada pode estar na faixa de cerca de  $1 \times 10^{11}$  a cerca de  $1 \times 10^{15}$  partículas virais para uma administração oral.

[0088] O vetor adenoviral pode ser quantificado por Análise via PCR Quantitativa (Q-PCR, *Quantitative PCR Analysis*), por exemplo com iniciadores e sonda planejados para a região de promotor de CMV usando curva padrão de diluição serial de DNA plasmídico contendo o genoma do vetor com o cassete de expressão incluindo o promotor de HCMV. O número de cópias na amostra de teste é determinado pelo método de análise linhas paralelas. Métodos alternativos para a quantificação de partícula de vetor podem ser HPLC analítica ou método espectrofotométrico baseado em

absorbância no comprimento de onda de 260 nm.

[0089] Uma quantidade imunologicamente eficaz de um ácido nucleico pode estar adequadamente entre 1 ng e 100 mg. Por exemplo, uma quantidade adequada pode ser de 1 µg a 100 mg. Uma quantidade apropriada do ácido nucleico específico (por exemplo, vetor) pode ser facilmente determinada por aquelas pessoas versadas na técnica. Quantidades eficazes exemplificadoras de um componente ácido nucleico podem estar entre 1 ng e 100 µg, como entre 1 ng e 1 µg (por exemplo, 100 ng a 1 µg), ou entre 1 µg e 100 µg, como 10 ng, 50 ng, 100 ng, 150 ng, 200 ng, 250 ng, 500 ng, 750 ng, ou 1 µg. Quantidades eficazes de um ácido nucleico podem também incluir de 1 µg a 500 µg, como entre 1 µg e 200 µg, como entre 10 e 100 µg, por exemplo 1 µg, 2 µg, 5 µg, 10 µg, 20 µg, 50 µg, 75 µg, 100 µg, 150 µg, ou 200 µg. Alternativamente, uma quantidade eficaz exemplificadora de um ácido nucleico pode estar entre 100 µg e 1 mg, como de 100 µg a 500 µg, por exemplo, 100 µg, 150 µg, 200 µg, 250 µg, 300 µg, 400 µg, 500 µg, 600 µg, 700 µg, 800 µg, 900 µg ou 1 mg.

[0090] Em geral, uma dose humana estará contida em um volume entre 0,3 mL e 2 mL. Portanto a mistura e/ou a composição, descrita na presente invenção, pode ser formulada de modo que, após a reconstituição da composição secada, seja administrado um volume de, por exemplo 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 1,0, 1,5 ou 2,0 mL de dose humana por componente imunogênico individual ou componentes imunogênicos combinados.

[0091] Uma pessoa versada na técnica pode ajustar estas doses, dependendo da via de administração e da aplicação de agente terapêutico ou de vacina para a qual o vetor recombinante é utilizado. Os níveis de expressão do transgene, ou de um adjuvante, o nível de anticorpo circulante, podem ser monitorados para determinar a frequência de administração de dosagem.

[0092] Se uma ou mais etapas de primeira exposição ao antígeno (*priming*) e/ou de reforço são usadas, esta etapa pode incluir uma dose única

que é administrada por hora, por dia, por semana ou por mês, ou por ano. Como um exemplo, mamíferos podem receber uma ou duas doses contendo entre cerca de 10 µg e cerca de 50 µg de plasmídeo em carreador. A quantidade ou o sítio de distribuição é desejavelmente selecionado(a) com base na identidade e na condição do mamífero.

[0093] Os níveis terapêuticos de, ou o nível de resposta imune contra, a proteína codificada pelo transgene selecionado pode(m) ser monitorado(s) para determinar a necessidade, se houver, de imunizações reforçadoras. Após uma avaliação da resposta de célula-T CD8+, ou opcionalmente, de títulos de anticorpo, no soro, imunizações reforçadoras opcionais podem ser desejadas. Opcionalmente, o vetor adenoviral pode ser liberado em uma administração única ou em vários regimes de combinação, por exemplo, em combinação com um regime ou curso de tratamento envolvendo outros ingredientes ativos ou em um regime de primoimunização-imunização reforçadora.

[0094] Salvo indicação em contrário, “terapia” ou “terapêutico” pode referir-se a qualquer uma de ou ambas terapia preventiva e terapia curativa.

[0095] A mistura aquosa ou composição secada pode estar contida em um frasco de vidro, quer siliconizado quer não siliconizado. Em uma modalidade, a mistura aquosa ou composição secada é provida em um frasco não siliconizado. A mistura aquosa adequada pode estar contida em um frasco não siliconizado e ser secada por congelamento quando contida naquele frasco.

[0096] A invenção também provê um kit compreendendo dois recipientes, cujo um primeiro recipiente compreende a composição adenoviral, conforme descrita na presente invenção, e um segundo recipiente compreende o líquido, conforme definido na presente invenção, para reconstituição da composição secada.

[0097] A invenção também provê um método para liofilização ou secagem por congelamento de um líquido contendo um vetor adenoviral,

como a mistura aquosa, conforme definida na presente invenção, para obter uma composição secada por congelamento, conforme definida na presente invenção, o método compreendendo uma etapa de recozimento. Liofilização ou secagem por congelamento habitualmente consiste em três fases de processo.

[0098] Na primeira fase do processo, é congelada uma mistura ou solução predominantemente aquosa. Subsequentemente, a água é removida primeiro por sublimação durante a secagem primária. Na terceira fase, a água não congelada é removida por difusão e dessorção durante a secagem secundária. Os inventores também descobriram que a introdução de uma etapa de recozimento durante a fase de congelamento do ciclo de liofilização tem uma influência positiva surpreendente sobre a estabilidade do vetor adenoviral. Consequentemente, a invenção também provê um método para secagem por congelamento de um líquido contendo um vetor adenoviral, como a mistura aquosa conforme descrita na presente invenção, pelo qual a etapa de congelamento do ciclo de secagem por congelamento compreende uma etapa de recozimento.

[0099] A temperatura e o tempo de congelamento e de secagem determinarão, no final, o teor de umidade da composição secada por congelamento. Em uma modalidade, o teor de umidade da composição secada por congelamento é de 1,4% (p/p) ou mais alto, por exemplo está entre 1,4 e 10% (p/p), entre 1,4 e 8% (p/p), entre 1,7 e 8% (p/p), entre 1,9 e 8% (p/p), entre 1,4 e 5% (p/p), entre 1,7 e 5% (p/p), entre 1,9 e 5% (p/p), entre 1,4 e 3% (p/p), entre 1,7 e 3% (p/p), ou entre 1,9 e 3% (p/p). Em uma modalidade específica, o teor de umidade da composição secada por congelamento é de 1,7% (p/p) ou mais alto, 1,8% (p/p) ou mais alto, ou, 1,9% (p/p) ou mais alto.

[00100] Para o propósito de definir o método descrito, os seguintes termos são usados como são conhecidos na técnica. O termo “temperatura de transição vítrea” ou “Tg” é a temperatura na qual um sólido amorfo torna-se

mole sob aquecimento ou quebradiço sob esfriamento. O termo “T<sub>g</sub>” refere-se à temperatura de transição vítrea no estado congelado. O termo “temperatura de colapso” ou “T<sub>c</sub>” refere-se à temperatura na qual um material amorfo amolece até o ponto que ele não pode mais manter sua própria estrutura. Os termos “secagem por congelamento” e “liofilização”, e, “secado por congelamento” e “liofilizado” são usados intercambiavelmente e referem-se ao mesmo processo de rapidamente congelar uma substância úmida, seguido por desidratação sob pressão reduzida.

[00101] O termo “etapa de anelamento”, como usado na presente invenção, refere-se a uma etapa do método nos ciclos de secagem por congelamento da composição, na qual durante a fase de congelamento, o produto é mantido em uma temperatura de subesfriamento especificada durante um período de tempo predeterminado. Como é conhecido pela pessoa versada, o recozimento resultará no amadurecimento de Ostwald dos cristais de gelo e na criococentração da matriz amorfa. Tipicamente, a temperatura de recozimento está (muito pouco) acima da T<sub>g</sub>'. Em uma modalidade, o recozimento é executado a uma temperatura entre (T<sub>g</sub>' + 0,5°C) e (T<sub>g</sub>' + 20°C), por exemplo a uma temperatura de -15°C±9°C ou -15°C±6°C, ou entre (T<sub>g</sub>' + 0,5°C) e (T<sub>g</sub>' + 10°C). Em qualquer caso, a temperatura de recozimento deve estar entre a T<sub>g</sub>' e a temperatura de fusão (T<sub>m</sub>) durante o recozimento. Em modalidades específicas, o recozimento é realizado a uma temperatura entre -4°C e -24°C, alternativamente entre -4°C e -20°C, alternativamente entre -4°C e -15°C, ou alternativamente entre -8°C e -15°C, por exemplo a -10°C±0,5°C. O recozimento pode ser realizado durante o congelamento do produto, isto é enquanto a amostra congelada estiver sendo formada, desde que o produto seja congelado (estado sólido) e em um estado vítreo (abaixo de T<sub>g</sub>'). Alternativamente, o recozimento é realizado após o congelamento do produto.

[00102] Em uma modalidade específica, a temperatura de recozimento

é de cerca de  $-10^{\circ}\text{C}$  (por exemplo  $-10^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ ), mais em particular se a mistura aquosa compreende sorbitol e trealose em uma razão de sorbitol para trealose entre 4/14 e 4/16,5.

[00103] Em uma modalidade, o produto é congelado (isto é temperatura do produto abaixo de  $T_g'$ ) antes da etapa de recozimento. Em uma modalidade, o congelamento é realizado pela exposição da amostra ou mistura aquosa a uma temperatura de prateleira constante a uma temperatura de congelamento que está abaixo de  $T_g'$ . Em uma modalidade alternativa, o produto pode ser congelado pela aplicação de congelamento no modo de temperatura de prateleira com rampa de temperatura (*shelf-ramp*), isto é redução gradual da temperatura de prateleira para uma temperatura de congelamento abaixo de  $T_g'$ . De acordo com as modalidades, a temperatura de congelamento é uma temperatura abaixo de  $T_g'$  menos  $5^{\circ}\text{C}$ , abaixo de  $T_g'$  menos  $7,5^{\circ}\text{C}$ , ou abaixo de  $T_g'$  menos  $10^{\circ}\text{C}$ , como a ou abaixo de  $-50^{\circ}\text{C}$ . De acordo com uma modalidade, a temperatura do produto (isto é a temperatura da amostra no secador por congelamento) no tempo que o ciclo de secagem por congelamento é iniciado está entre  $+2^{\circ}\text{C}$  e  $+8^{\circ}\text{C}$ .

[00104] Quando se aplica o congelamento no modo de temperatura de prateleira com rampa de temperatura (*shelf-ramp*), a temperatura é reduzida a uma velocidade de pelo menos  $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , pelo menos  $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , pelo menos  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ou pelo menos  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , e/ou uma velocidade de menos que  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,  $7,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ,  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ou menos que  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Alternativamente, a temperatura é reduzida a uma velocidade de 0,1 a  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 0,1 a  $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 0,2 a  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , ou 0,3 a  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . De acordo com outras modalidades, a temperatura de prateleira alcançada é mantida durante cerca de ou pelo menos 1 hora (ou 60 minutos).

[00105] Em uma outra modalidade, na situação na qual o produto é congelado antes da aplicação da etapa de recozimento, após o congelamento inicial da amostra ou do produto, a temperatura de prateleira é aumentada

para uma temperatura acima de  $T_g'$  para iniciar a etapa de recozimento, como para uma temperatura acima de  $T_g'$  mais  $0,5^\circ\text{C}$ , acima de  $T_g'$  mais  $1^\circ\text{C}$ , acima de  $T_g'$  mais  $3^\circ\text{C}$ , acima de  $T_g'$  mais  $5^\circ\text{C}$ , acima de  $T_g'$  mais  $10^\circ\text{C}$  ou acima de  $T_g'$  mais  $20^\circ\text{C}$ . Em qualquer caso, a temperatura é mantida abaixo de  $T_m$  durante o recozimento. Em uma modalidade, a temperatura é aumentada a uma velocidade de pelo menos  $0,1^\circ\text{C}/\text{min}$ , pelo menos  $0,2^\circ\text{C}/\text{min}$ , pelo menos  $0,3^\circ\text{C}/\text{min}$  ou pelo menos  $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ , e/ou uma velocidade de menos que  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $7,5^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  ou menos que  $3^\circ\text{C}/\text{min}$ . Alternativamente, a temperatura é aumentada a uma velocidade de  $0,1$  a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $0,1$  a  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $0,2$  a  $3^\circ\text{C}/\text{min}$ , ou  $0,3$  a  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . De acordo com outras modalidades, a temperatura de recozimento é mantida durante pelo menos duas e/ou até quatro horas.

[00106] Em uma outra modalidade, após a etapa de recozimento, a temperatura de prateleira é reduzida para uma temperatura abaixo de  $T_g'$  antes do início da secagem sob pressão reduzida, como para uma temperatura abaixo de  $T_g'$  menos  $5^\circ\text{C}$ , abaixo de  $T_g'$  menos  $7,5^\circ\text{C}$ , ou abaixo de  $T_g'$  menos  $10^\circ\text{C}$ , como a ou abaixo de  $-50^\circ\text{C}$ . Em uma modalidade, para alcançar isto, a temperatura é reduzida a uma velocidade de pelo menos  $0,1^\circ\text{C}/\text{min}$ , pelo menos  $0,2^\circ\text{C}/\text{min}$ , pelo menos  $0,3^\circ\text{C}/\text{min}$  ou pelo menos  $0,5^\circ\text{C}/\text{min}$ , e/ou uma velocidade de menos que  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ , menos que  $7,5^\circ\text{C}/\text{min}$ , menos que  $5^\circ\text{C}/\text{min}$  ou menos que  $3^\circ\text{C}/\text{min}$ . Alternativamente, a temperatura é reduzida a uma velocidade de  $0,1$  a  $10^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $0,1$  a  $5^\circ\text{C}/\text{min}$ ,  $0,2$  a  $3^\circ\text{C}/\text{min}$ , ou  $0,3$  a  $1^\circ\text{C}/\text{min}$ . De acordo com outras modalidades, a temperatura de prateleira alcançada é mantida durante cerca de ou pelo menos 1 hora (ou 60 minutos).

[00107] A secagem sob pressão reduzida, conforme considerada a etapa b.ii do método de liofilização, descrito na presente invenção, será tipicamente realizada em duas fases, isto é secagem primária e secagem secundária. Em uma modalidade, a etapa b.ii. do método incluirá:

- etapa b.ii.1. para secagem primária a uma temperatura abaixo

da Tc do produto, e,

- etapa b.ii.2. para secagem secundária a uma temperatura acima da Tc do produto e abaixo da Tg do produto.

[00108] Em modalidades específicas, a secagem primária das composições, descritas na presente invenção, é realizada a  $-30^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ , a secagem secundária das composições, descritas na presente invenção, é realizada a  $10^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ , ou, a secagem primária das composições, descritas na presente invenção, é realizada a  $-30^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$  e a secagem secundária é realizada a  $10^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ .

[00109] Em modalidades específicas, quando secam-se por congelamento as composições, descritas na presente invenção, as condições da secagem primária são aplicadas durante 24 horas ou mais, entre 24 e 40 horas, ou, entre 30 e 40 horas.

[00110] Em uma outra modalidade, a secagem primária é realizada a uma pressão mais baixa que 9,0 Pa e/ou acima de 4,0 Pa. As condições da secagem primária podem ser aplicadas durante até 24 horas ou mais.

[00111] Outra modalidade refere-se à temperatura de secagem secundária que é alcançada pela elevação da temperatura de prateleira a uma velocidade de  $0,1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , pelo menos  $0,2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , pelo menos  $0,3^{\circ}\text{C}/\text{min}$  ou pelo menos  $0,5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , e/ou uma velocidade de menos que  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , menos que  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , ou menos que  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Alternativamente, a temperatura de secagem secundária é alcançada pela elevação da temperatura de prateleira a uma velocidade de 0,1 a  $3^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , 0,2 a  $2^{\circ}\text{C}/\text{min}$ , ou 0,3 a  $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . De acordo com ainda uma outra modalidade, a temperatura de secagem secundária é pelo menos  $-10^{\circ}\text{C}$  e/ou abaixo  $30^{\circ}\text{C}$ . Em uma modalidade específica, a temperatura de secagem secundária para as composições contendo sorbitol é de  $25^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ . Em uma modalidade alternativa, quando se secam por congelamento as composições, descritas na presente invenção, a temperatura de secagem secundária é de  $10^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ .



[00112] As condições da secagem secundária podem ser aplicadas durante pelo menos ou durante cerca de três horas, pelo menos cerca de quatro horas, pelo menos cerca de cinco horas, ou, pelo menos, ou durante cerca de seis horas.

[00113] As modalidades específicas da invenção incluem:

**modalidade 1:** Uma composição compreendendo (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 18% (p/v) de trealose e (viii) 3,5% (p/v) de sorbitol.

[00114] **Modalidade 2:** Uma composição compreendendo (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose e (vii) 23% (p/v) de trealose.

[00115] **Modalidade 3:** Uma composição compreendendo (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 18% (p/v) de trealose, (viii) 3,5% (p/v) de sorbitol e (ix) 0,02% (p/v) de TWEEN 80.

[00116] **Modalidade 4:** Uma composição compreendendo (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 23% (p/v) de trealose e (ix) 0,02% (p/v) de TWEEN 80.

[00117] **Modalidade 5:** Uma composição liofilizada ou secada por congelamento compreendendo (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 18% (p/v) de trealose e (viii) 3,5% (p/v) de sorbitol.

[00118] **Modalidade 6:** Uma composição liofilizada ou secada por congelamento compreendendo (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose e (vii) 23% (p/v) de trealose.

[00119] **Modalidade 7:** Uma composição liofilizada ou secada por congelamento compreendendo (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 18% (p/v) de trealose, (viii) 3,5% (p/v) de sorbitol e (ix) 0,02% (p/v) de TWEEN 80.

[00120] **Modalidade 8:** Uma composição liofilizada ou secada por congelamento compreendendo (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 23% (p/v) de trealose e (ix) 0,02% (p/v) de TWEEN 80.

[00121] **Modalidade 9:** Uma composição consistindo essencialmente em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 18% (p/v) de trealose e (viii) 3,5% (p/v) de sorbitol.

[00122] **Modalidade 10:** Uma composição consistindo essencialmente em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose e (vii) 23% (p/v) de trealose.

[00123] **Modalidade 11:** Uma composição consistindo essencialmente em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 18% (p/v) de trealose, (viii) 3,5% (p/v) de sorbitol e (ix) 0,02% (p/v) de TWEEN 80.

[00124] **Modalidade 12:** Uma composição consistindo essencialmente em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 23% (p/v) de trealose e (ix) 0,02% (p/v) de TWEEN 80.

[00125] **Modalidade 13:** Uma composição liofilizada ou secada por congelamento consistindo essencialmente em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10

mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 18% (p/v) de trealose e (viii) 3,5% (p/v) de sorbitol.

[00126]       **Modalidade 14:** Uma composição liofilizada ou secada por congelamento consistindo essencialmente em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose e (vii) 23% (p/v) de trealose.

[00127]       **Modalidade 15:** Uma composição liofilizada ou secada por congelamento consistindo essencialmente em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 18% (p/v) de trealose, (viii) 3,5% (p/v) de sorbitol e (ix) 0,02% (p/v) de TWEEN 80.

[00128]       **Modalidade 16:** Uma composição liofilizada ou secada por congelamento consistindo essencialmente em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 23% (p/v) de trealose e (ix) 0,02% (p/v) de TWEEN 80.

[00129]       **Modalidade 17:** Uma composição consistindo em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 18% (p/v) de trealose, (viii) 3,5% (p/v) de sorbitol e (ix) água para injeção.

[00130]       **Modalidade 18:** Uma composição consistindo em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 23% (p/v) de trealose e (ix) água para injeção.

[00131]       **Modalidade 19:** Uma composição consistindo em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 18% (p/v) de trealose, (viii) 3,5% (p/v) de sorbitol, (ix) 0,02% (p/v) de TWEEN 80 e (ix)

água para injeção.

[00132] **Modalidade 20:** Uma composição consistindo em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 23% (p/v) de trealose, (ix) 0,02% (p/v) de TWEEN 80 e (ix) água para injeção.

[00133] **Modalidade 21:** Uma composição liofilizada ou secada por congelamento consistindo em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 18% (p/v) de trealose e (viii) 3,5% (p/v) de sorbitol.

[00134] **Modalidade 22:** Uma composição liofilizada ou secada por congelamento consistindo em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose e (vii) 23% (p/v) de trealose.

[00135] **Modalidade 23:** Uma composição liofilizada ou secada por congelamento consistindo em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 18% (p/v) de trealose, (viii) 3,5% (p/v) de sorbitol e (ix) 0,02% (p/v) de TWEEN 80.

[00136] **Modalidade 24:** Uma composição liofilizada ou secada por congelamento consistindo em (i) um vetor adenoviral, (ii) 10 mM de TRIS, (iii) 10 mM de Histidina, (iv) 5 mM de NaCl, (v) 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, (vi) 2% (p/v) de sacarose, (vii) 23% (p/v) de trealose e (ix) 0,02% (p/v) de TWEEN 80.

[00137] **Modalidade 25:** Uma composição de qualquer uma das Modalidades 1 a 24 na qual o vetor adenoviral é um adenovetor simiano, como um adenovetor de chimpanzé. Particularmente um vetor adenoviral selecionado dentre ChAd3, ChAd63, ChAd83, ChAd155, ChAd157, Pan 5, Pan 6, Pan 7 ou Pan 9, ainda mais particularmente um vetor adenoviral é selecionado dentre ChAd3, ChAd63, ChAd83, ChAd155, ChAd157, e

PanAd3 e ainda muito mais particularmente o vetor adenoviral é ChAd155.

[00138] A presente invenção será agora adicionalmente descrita por meio dos seguintes exemplos não limitadores.

### EXEMPLOS

#### **Exemplo 1 - Avaliação do efeito do sorbitol e comparação entre trealose e sacarose**

[00139] Os objetivos do experimento foram avaliar o efeito do sorbitol sobre o adenovírus durante a secagem por congelamento, e avaliar a influência da substituição da carga de trealose total por sacarose. O vetor ChAd155 usado no experimento codifica uma proteína de vírus sincicial respiratório (ChAd155-RSV) e é descrito em PCT/EP2016/063297. As partículas de ChAd155 foram formuladas em uma mistura aquosa compreendendo, ainda, os excipientes Tris 10 mM - Histidina 10 mM -  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  1 mM - Tween 80 0,02% (p/v) - NaCl 5 mM – Trealose ou Sacarose 23% (p/v) – Sorbitol 2% (p/v). A concentração de açúcar foi calculada para alcançar a osmolalidade máxima permitida para injeção pediátrica, isto é 900 mOsm/kg. A concentração das partículas virais foi de  $1,1 \times 10^{11}$  pU/mL. Esta composição foi calculada para ser obtida após a reconstituição do material secado por congelamento com 0,625 mL de água para injeção em frascos de vidro não siliconizados cheios com  $0,5\text{mL} \pm 0,02$  mL. Então os frascos foram parcialmente vedados com uma tampa de borracha bromobutílica “Helvoet FM460” inserida na posição de secagem por congelamento (parcialmente inserida para permitir que vapor de água escapasse durante o ciclo de secagem por congelamento).

[00140] O ciclo de secagem por congelamento usado compreendeu as seguintes etapas (conforme mostradas na Figura 1):

##### 1. Congelamento:

- A temperatura de prateleira foi ajustada a  $-52^\circ\text{C}$ . Os frascos cheios foram carregados para dentro do secador por congelamento quando a

temperatura de prateleira estava a ou abaixo de  $-45^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram então esfriadas a  $-52^{\circ}\text{C}$  durante um mínimo de uma hora.

[00141] 2. Etapa de recozimento:

- A temperatura de prateleira foi elevada para alcançar a temperatura de recozimento-alvo ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) em uma hora.

[00142] ○ A temperatura de recozimento foi mantida durante duas horas.

[00143] ○ A temperatura de prateleira foi reduzida de novo de  $-10^{\circ}\text{C}$  para  $-50^{\circ}\text{C}$  no curso de uma hora.

[00144] ○ O produto foi mantido a  $-50^{\circ}\text{C}$  durante pelo menos uma hora.

[00145] 3. Secagem primária:

- A pressão da câmara foi ajustada a 8,0 Pa e a temperatura de prateleira foi elevada de  $-50^{\circ}\text{C}$  para  $-25^{\circ}\text{C}$  durante três horas. A temperatura de prateleira e a pressão da câmara foram mantidas durante 24 horas.

[00146] 4. Secagem secundária:

- A temperatura de prateleira foi elevada de  $-25^{\circ}\text{C}$  para  $+10^{\circ}\text{C}$  durante seis horas, enquanto que a pressão da câmara foi reduzida a 4,0 Pa. Quando a temperatura de prateleira alcançou  $+10^{\circ}\text{C}$ , estas condições foram mantidas durante horas.

[00147] No final do ciclo de secagem por congelamento, a câmara foi cheia com nitrogênio seco até que fosse alcançada uma pressão da câmara de 82,5 kPa, e então as tampas foram completamente inseridas nos frascos (tampadura de vedação). Quando a tampadura de vedação foi completada, a pressão da câmara foi equilibrada para a pressão atmosférica para descarga. A temperatura da câmara foi mantida a de  $+2$  a  $+8^{\circ}\text{C}$  até que os frascos fossem descarregados. Os frascos foram então descarregados e lacrados com tampas de alumínio *flip-off*.

[00148] Os resultados deste experimento são apresentados na tabela abaixo:

Duas amostras de ChAd155 *bulk* purificado, diluídas para alcançar a concentração de vacina reconstituída, foram usadas antes e após o tratamento durante 30 minutos a 60°C como controle positivo (controle *bulk* purificado fresco) e controle negativo (controle *bulk* purificado degradado) respectivamente.

	Descrição da amostra	Temperatura de transição vítrea (°C) – (Figura 2)	Umidade residual (%)	PicoGreen® - DNA livre (%)	Infectividade de HEXON normalizada (%) – (Figura 3)	Recuperação por AEX-HPLC (%)
1	Trealose 23%	44,4	3,2	5,3	72,1	71,3
2	Sacarose 23%	21,2	5,4	9,5	63,5	61,7
3	Trealose 23 + Sorbitol 2%	40,0	4,2	3,6	94,3	77,0
4	Sacarose 23% + Sorbitol 2%	5,3	7,1	2,6	72,6	82,0
5	Controle <i>bulk</i> purificado fresco	/	/	0,0	100,0	102,9
6	Controle <i>bulk</i> purificado degradado	/	/	100,0	0,0	5,6

[00149] O ensaio PicoGreen® mede a degradação das partículas virais. O reagente “Quant-iT™ PicoGreen dsDNA” é um corante de ácido nucleico fluorescente ultrasensível para quantificação de DNA de fita dupla em solução.

[00150] A infectividade de HEXON das partículas adenovirais é medida via detecção por citometria de fluxo de células coradas para a proteína capsídica *hexon* de adenovírus. A concentração de unidades de partículas adenovirais é também medida usando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência por Troca Aniônica (AEX-HPLC, *Anion Exchange - High Performance Liquid Chromatography*) acoplado a um detector de fluorescência e usando um padrão de adenovírus comercial como referência. Os sistemas cromatográficos usados foram “Dionex Ultimate 3000” e “Waters Acquity UPLC Biocompatible” (classe-H).

[00151] As composições contendo trealose mostraram um aumento da

temperatura de transição vítrea induzindo uma melhor estabilidade em armazenamento do produto em alta temperatura. Também, a infectividade aumentou (10-20%) nas formulações contendo trealose comparadas com as formulações contendo sacarose.

[00152] Para as formulações contendo sorbitol, foi observado que a presença de sorbitol resultou em um decréscimo da temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), o que pôde influenciar a aparência do bolo resultante. Conforme ilustrado na Figura 3, a infectividade melhorou em 10-20% para as composições contendo sorbitol.

### **Exemplo 2 - Determinação de DOE estatístico para a formulação contendo trealose, sorbitol e NaCl**

[00153] O objetivo do experimento foi avaliar várias faixas de concentração de trealose, sorbitol e NaCl para determinar as condições ótimas para o candidato adenovírus secado por congelamento. O adenovírus usado foi ChAd155-RSV. O efeito protetor de trealose e sorbitol conforme observado no Exemplo 1 foi adicionalmente avaliado juntamente com a influência do NaCl.

[00154] As partículas de ChAd155-RSV foram formuladas em uma mistura aquosa compreendendo, adicionalmente, os excipientes Tris 10 mM - Histidina 10 mM -  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  1mM - Tween 80 0,02% (p/v) - NaCl (variável: 5, 25 ou 45 mM) – Trealose (14, 18,5 ou 23% (v/p)) – Sorbitol (0, 2 ou 4% (v/p) ). A concentração das partículas virais avaliada foi de  $1,1 \times 10^{11}$  pU/mL. As composições foram calculadas para serem alcançadas após a reconstituição da composição secada por congelamento com 0,625 mL de água para injeção em frascos de vidro do tipo não siliconizado cheios com  $0,5mL \pm 0,02mL$ . Então os frascos foram parcialmente vedados com uma tampa de borracha bromobutílica “Helvoet FM460” inserida na posição de secagem por congelamento (parcialmente inserida para permitir que o vapor de água escapasse durante o ciclo de secagem por congelamento).



[00155] As seguintes composições foram testadas:

- amostra 1: trealose (T) 18,5% (v/p) - sorbitol (S) 0% (v/p)

NaCl (N) 25 mM

- amostra 2: T 14% - S 0% - N 5 mM

- amostra 3: T 18,5% - S 4% - N 25 mM

- amostra 4: T 18,5% - S 2% - N 25 mM

- amostra 5: T 23% - S 0% - N 5 mM

- amostra 6: T 23% - S 4% - N 45 mM

- amostra 7: T 18,5% - S 2% - N 25 mM

- amostra 8: T 14% - S 4% - N 5 mM

- amostra 9: T 23% - S 0% - N 45 mM

- amostra 10: T 14% - S 2% - N 25 mM

- amostra 11: T 18,5% - S 2% - N 5 mM

- amostra 12: T 14% - S 0% - N 45 mM

- amostra 13: T 18,5% - S 2% - N 25 mM

- amostra 14: T 14% - S 4% - N 45 mM

- amostra 15: T 23% - S 2% - N 25 mM

- amostra 16: T 18,5% - S 2% - N 45 mM

- amostra 17: T 23% - S 4% - N 5 mM

- amostra 18: controle *bulk* purificado fresco

- amostra 19: controle *bulk* purificado degradado

[00156] Duas amostras de ChAd155 *bulk* purificado, diluídas para alcançar a concentração de vacina reconstituída, foram usadas antes e após o tratamento durante 30 minutos a 60°C como controle positivo (controle *bulk* purificado fresco) e controle negativo (controle *bulk* purificado degradado) respectivamente.

[00157] O ciclo de secagem por congelamento usado compreendeu as seguintes etapas (conforme mostrado na Figura 4):

1. Congelamento:

- A temperatura de prateleira foi ajustada a  $-52^{\circ}\text{C}$ . Os frascos cheios foram carregados para dentro do secador por congelamento quando a temperatura de prateleira estava a ou abaixo de  $-45^{\circ}\text{C}$ . As amostras foram então esfriadas a  $-52^{\circ}\text{C}$  durante um mínimo de uma hora.

[00158] 2. Etapa de recozimento:

- A temperatura de prateleira foi elevada para alcançar a temperatura de recozimento-alvo ( $-10^{\circ}\text{C}$ ) em uma hora.

[00159] ○ A temperatura de recozimento foi mantida durante duas horas.

[00160] ○ A temperatura de prateleira foi reduzida de novo de  $-10^{\circ}\text{C}$  para  $-50^{\circ}\text{C}$  no curso de uma hora.

[00161] ○ O produto foi mantido a  $-50^{\circ}\text{C}$  durante pelo menos uma hora.

[00162] 3. Secagem primária:

- A pressão da câmara foi ajustada a 8,0 Pa e a temperatura de prateleira foi elevada de  $-50^{\circ}\text{C}$  para  $-30^{\circ}\text{C}$  durante três horas. A temperatura de prateleira e a pressão da câmara foram mantidas durante 24 horas.

[00163] 4. Secagem secundária:

- A temperatura de prateleira foi elevada de  $-25^{\circ}\text{C}$  para  $+10^{\circ}\text{C}$  durante seis horas, enquanto que a pressão da câmara foi reduzida a 4,0 Pa. Quando a temperatura de prateleira alcançou  $+10^{\circ}\text{C}$ , estas condições foram mantidas durante horas.

[00164] No final do ciclo de secagem por congelamento, a câmara foi cheia com nitrogênio seco até que fosse alcançada uma pressão da câmara de 82,5 kPa, e então as tampas foram completamente inseridas nos frascos (tampadura). Quando a tampadura foi completada, a pressão da câmara foi equilibrada para a pressão atmosférica para descarga. A temperatura da câmara foi mantida a de  $+2$  a  $+8^{\circ}\text{C}$  até que os frascos fossem descarregados.

Os frascos foram então descarregados e lacrados com tampas de alumínio *flip-off*.

[00165] Todas as amostras foram analisadas no instante de tempo T0 e após armazenamento durante uma semana a +4°C, +25°C (T1W25) ou +30°C.

[00166] Os resultados deste experimento são apresentados na tabela abaixo:

	Temperatura de transição vítrea (°C) (Figura 5)	Umidade residual (%) (Figura 6)	Osmolalidade (mOsm/kg) (Figura 7)	PicoGreen® - DNA livre (%) (Figura 8)		Infectividade de HEXON normalizada (%) (Figura 9)		Recuperação por AEX-HPLC (%) (Figura 10)		qPCR (gE/mL)
Instante de tempo	T0	T0	T0	T0	T1W25	T0	T1W25	T0 (por DIONEX)	T1W25 (por classe-H)	T0
1	75,9	2,4	676	17,0	19,8	40,6	47,7	36,2	18,4	1,05x10 <sup>11</sup>
2	81,0	1,9	497	13,9	18,9	37,9	40,0	24,2	37,5	1,10x10 <sup>11</sup>
3	23,4	3,5	923	3,3	4,3	56,4	71,9	70,9	72,4	1,13x10 <sup>11</sup>
4	42,7	1,8	811	7,9	24,7	61,1	26,4	60,0	33,5	1,10x10 <sup>11</sup>
5	68,7	2,8	786	7,5	10,4	56,1	36,2	50,1	57,9	1,06x10 <sup>11</sup>
6	21,4	4,7	1131	3,2	6,5	83,0	50,2	66,6	65,2	1,14x10 <sup>11</sup>
7	41,4	2,2	801	8,8	21,1	64,5	35,7	55,2	36,0	1,14x10 <sup>11</sup>
8	20,1	3,5	737	2,0	0,1	106,6	90,1	76,0	92,7	1,20x10 <sup>11</sup>
9	71,2	2,9	876	14,7	19,1	68,4	36,9	37,0	43,2	9,89x10 <sup>10</sup>
10	41,4	2,0	650	11,5	28,6	77,3	20,1	52,2	27,2	1,13x10 <sup>11</sup>
11	43,2	2,7	764	4,4	11,3	89,6	50,0	57,0	47,5	1,12x10 <sup>11</sup>
12	69,0	2,7	573	28,3	30,7	39,7	24,7	21,2	24,4	1,10x10 <sup>11</sup>
13	42,2	2,3	795	8,9	23,1	80,2	28,7	48,4	34,2	1,01x10 <sup>11</sup>
14	11,7	3,5	816	5,2	0,1	87,5	83,3	61,8	89,7	9,99x10 <sup>10</sup>
15	39,9	3,7	941	5,6	15,7	85,4	32,7	54,3	47,8	1,03x10 <sup>11</sup>
16	41,1	2,0	847	12,0	28,5	61,6	21,2	40,5	27,8	9,26x10 <sup>10</sup>
17	28,7	3,9	1035	1,3	4,3	79,5	54,9	56,5	75,7	9,35x10 <sup>10</sup>

18	/	/	/	0,0	100,0	106,4	103,8	1,62 $\times 10^{11}$
19	/	/	/	100,0	0,0	6,0	8,3	1,59 $\times 10^{11}$

[00167] O ensaio PicoGreen® e infectividade de HEXON foram conforme descrito no Exemplo 1. PCR Quantitativa (qPCR), conforme descrita na presente invenção, permite que se determine o teor de vírus. O teste reconhece o promotor de hCMV presente no adenovírus. A amostra de DNA foi extraída com “Quiagen QIAmp 96 DNA Blood”. Os resultados são expressados como equivalentes de genoma por mililitro (gE/mL). Os melhores resultados consideram os parâmetros totais (por exemplo o valor de PicoGreen® no nível mais baixo, a infectividade e o teor por HPLC no nível mais alto, osmolaridade menor que 900 mOsm/kg), foram alcançados com as composições compreendendo 14 a 18,5% de trealose, 4% de sorbitol e NaCl < 25 mM.

[00168] Após uma análise estatística, as seguintes composições otimizadas foram identificadas com base em diferentes conjuntos de restrições de parâmetros (consulte a Figura 11 para representação gráfica 1 de design de experimentos (DOE)):

- Não considerando restrições com respeito à Tg, a melhor candidata seria Trealose = 14% / Sorbitol = 4% / NaCl= 5 mM.

[00169] - Considerando que a Tg deveria ser  $\geq 25^{\circ}\text{C}$ , as melhores candidatas seriam Trealose = 14% - 16% / Sorbitol = 3% / NaCl= 5 mM.

[00170] Para as composições nas quais o teor mais alto de trealose é desejável, as seguintes composições otimizadas foram identificadas (consulte a Figura 12 para representação gráfica 2 de DOE):

- trealose = 22%, sorbitol = 2% e NaCl = 5 mM.

[00171] O efeito do teor de sorbitol sobre a Tg da composição secada por congelamento influenciou a aparência do bolo resultante e a estabilidade da partícula adenoviral armazenada no mesmo. O decréscimo da temperatura de transição vítrea das candidatas incluindo sorbitol na composição delas

resultou em aparência insatisfatória do bolo (fusão/colapso) após uma semana a +25°C e +30°C. Foi observado que a temperatura de transição vítrea reduzida foi diretamente correlacionada com o teor de umidade (umidade residual) medido no bolo após a etapa de secagem por congelamento. Entretanto, surpreendentemente, ao mesmo tempo foi observado que as amostras com teor de umidade mais alto (medido por titulação de Karl Fisher) mantiveram melhor a infectividade da partícula adenoviral após o armazenamento. Não obstante a aparência fundida dos bolos, a infectividade permaneceu mais alta, desde que fosse mantido um teor de umidade mínimo de pelo menos 1,8% p/p.

### **Exemplo 3 – DOE estatístico para a formulação de trealose/sorbitol/NaCl**

[00172] Os resultados do Exemplo 2 confirmaram as faixas ótimas para Trealose (14 - 16%), Sorbitol (3 - 4%) e NaCl (5 mm).

[00173] Outras composições foram testadas para complementar os dados do Exemplo 2 usando o mesmo ChAd155-RSV. Para as composições avaliadas, a molaridade de NaCl foi fixada em 5 mM. Os teores de trealose e de sacarose foram variados como segue:

<i>Composição</i>	<i>Trealose</i>	<i>Sacarose</i>
1	14%	3%
2	14%	4%
3	16%	3%
4	16%	3,5%
5	16%	4%
6	18%	3%
7	18%	4%
8*	20%	3,5%

\* Osmolalidade resultante de 910 mOsm/kg

[00174] Duas amostras de ChAd155 *bulk* purificado diluídas para alcançar a concentração de vacina reconstituída foram usadas antes e após o tratamento durante 30 minutos a 60°C como controles positivo e negativo respectivamente.

[00175] Também o ciclo de secagem por congelamento foi avaliado com o propósito de melhorar a estabilidade da aparência do bolo após o armazenamento (especialmente a +25°C (temperatura ambiente) com a

finalidade de incluir o tempo para reconstituição e administração ao paciente após o armazenamento à temperatura fria).

[00176] No Exemplo 2, foi determinado que a influência da Tg decrescida na presença de sorbitol está diretamente correlacionada com o teor de umidade (umidade residual) medido no bolo após a etapa de secagem por congelamento. Embora os dados mostrassem que o teor de umidade teve um efeito protetor sobre a infectividade de adenovírus sob estabilidade, a aparência insatisfatória dos bolos (aspecto fundido) é indesejável. Para aquele propósito, o ciclo de secagem por congelamento ou liofilização foi adicionalmente otimizado como segue:

- ciclo de liofilização (1): fase de secagem primária mais longa (+10h) foi usada em combinação com a mais alta temperatura de secagem secundária (+25°C) (consulte a Figura 13).

[00177] - ciclo de liofilização (2): fase de secagem primária mais longa (+10h) foi usada em combinação com a temperatura de secagem secundária de +10°C (consulte a Figura 14).

[00178] Os produtos secados por congelamento foram avaliados no instante de tempo T0 e após a estabilidade de uma semana (W) a +4°C (T1W4), +25°C (T1W25) e +30°C (T1W30).

[00179] Os resultados deste experimento são apresentados nas tabelas abaixo:

Leituras		Tg (°C)	Umidade residual (%)	Osmolalidade (mOsm/kg)	Infectividade de Hexon (% normalizada) – Figura 16	Teste PicoGreen® (% normalizada) – Figura 15		
	Ciclo de liofilização				T0	T0	T1W4	T1W25
1	(2)	34,5	2,9	676	93	4	5	4
	(1)	52,7	0,9	661	114	6	5	8
2	(2)	19,6	4,0	726	99	2	2	1
	(1)	43,4	1,3	747	110	3	3	7
3	(2)	31,3	3,3	727	92	3	4	10
	(1)	56,3	0,9	760	85	5	5	7
4	(2)	27,2	5,0	761	82	1	2	0
	(1)	50,3	1,1	764	104	3		6
5	(2)	23,7	4,1	796	82	3	2	1
	(1)	49,9	0,9	829	99	3	3	6
6	(2)	44,0	2,7	802	94	5	3	11

	(1)	56,5	0,8	813	109	4	3	6
7	(2)	26,3	3,7	882	93	2	2	7
	(1)	50,6	0,9	889	126	2	2	5
8	(2)	31,7	3,9	906	107	3	3	9
	(1)	54,1	0,9	919	98	3	2	5
Controle positivo		/	/	/	100	0		
Controle negativo		/	/	/	0	100		
Leituras		Teor por AEX-HPLC (recuperação %) – Figura 17			Infectividade CCID50 (log)	Razão de teor por HPLC / Infectividade CCID50 – Figura 18		
	Ciclo de liofilização	T0	T1W4	T1W25				
1	(2)	68	78	79	/	/		
	(1)	64	75	65	/	/		
2	(2)	79	89	94	9,0	87,4		
	(1)	74	80	69	/	/		
3	(2)	77	84	60	/	/		
	(1)	63	68	62	/	/		
4	(2)	81	89	95	9,2	54,3		
	(1)	71	79	65	/	/		
5	(2)	76	87	91	9,1	70,5		
	(1)	69	78	63	/	/		
6	(2)	68	79	45	/	/		
	(1)	64	78	64	/	/		
7	(2)	76	85	68	8,7	166		
	(1)	70	82	71	/	/		
8	(2)	72	83	61	8,4	317		
	(1)	71	70	77	/	/		
Controle positivo		102	118		9,2	70,5		
Controle negativo		12	8		<3,0	13730000		

[00180] O ensaio PicoGreen®, a infectividade de HEXON e teor por AEX-HPLC foram conforme descrito no Exemplo 1. A infectividade CCID50 é uma medida do título de adenovírus. A Dose 50% Infeciosa em Cultura Celular (CCID50) é um ensaio de diluição de ponto final que quantifica a quantidade de vírus requerida para produzir um efeito citopático em 50% das células em um determinado volume. No presente exemplo, o título é expressado em uma escala de log 10 (Log CCID50/mL). É medido pela inoculação de amostras de diluição seriada em células indicadoras. Após o tempo de incubação (7 dias a 37°C para adenovírus) a proteína *hexon* de adenovírus foi imunocorada e os resultados foram determinados microscopicamente.

[00181] Os melhores resultados considerando-se todos os parâmetros (por exemplo valor de PicoGreen® no nível mais baixo, infectividade e teor

por HPLC no nível mais alto, osmolalidade menor que 900 mOsm/kg) foram alcançados usando o ciclo de secagem por congelamento 2. Composição 2 (Trealose 14% - Sorbitol 4%), Composição 4 (Trealose 16% - Sorbitol 3,5%) e Composição 5 (Trealose 16% - Sorbitol 4%) apresentaram o melhor desempenho em todos os parâmetros.

#### Exemplo 4 – Estabilidade de adenovírus liofilizado

[00182] Estudos de estabilidade das composições liofilizadas foram realizados durante o curso de cinco meses a 25°C ou de sete meses a 15°C. Extrapolação dos dados de tempo real para três anos foi também realizada usando modelos estatísticos baseados na suposição de que a degradação seguiria um perfil similar. Dois modelos de estabilidade foram usados para extrapolar o teor viral, medido por HPLC e a infectividade, medida por separação de células ativadas por fluorescência (FACS, *Fluorescent Activated Cell Sorting*), expressada em Unidades Internacionais (UI). (1) Modelo Linear:  $\hat{Y} = \alpha_0 + \alpha_1 \times \text{Tempo}$ ; (2) Modelo de Decaimento de Primeira Ordem:  $\hat{Y} = \beta_1 \times e^{\beta_2 \times \text{Tempo}}$  e (2) Decaimento de Primeira Ordem (com assíntota):  $\hat{Y} = \beta_0 + \beta_1 \times e^{\beta_2 \times \text{Tempo}}$ . Ambos os dados medidos e extrapolados são mostrados na seguinte tabela.

Temperatura da secagem secundária	Formulação	Perda medida na secagem por congelamento (HPLC)	Extrapolação (3 anos)	
			Modelo Linear	Modelo de Decaimento de Primeira Ordem
15°C (7 meses)	Trealose 18% + Sorbitol 3,5%	-27%	(-28%)	(-6%)
	Trealose 23%	-43%	+4%	(-3%)
25°C (5 meses)	Trealose 18% + Sorbitol 3,5%	-32%	(-19%)	(-13%)
	Trealose 23%	-48%	(-21%)	(-4%)

[00183] A secagem secundária a 15°C resultou em maior estabilidade, conforme medida em perda de adenovírus, do que a secagem secundária a 25°C. Foram observados dois perfis, conforme mostrados nas Figuras 18 e 19. A Figura 18 mostra a estabilidade de adenovírus formulado com quer 18% de trealose + 3,5% de sorbitol quer 23% de trealose a 4°C durante 200 dias, a uma temperatura de secagem secundária de 15°C. A Figura 19 mostra a



estabilidade de adenovírus formulado com quer 18% de trealose + 3,5% de sorbitol quer 23% de trealose a 4°C durante o curso de 200 dias, a uma temperatura de secagem secundária de 25°C.

[00184] Conforme mostrado nas Figuras 18 e 19, uma concentração de 23% de trealose resultou em uma perda relativamente mais alta (aproximadamente 45%) do que uma concentração de 18% de trealose + 3,5% de sorbitol sob secagem por congelamento, com pouca perda subsequente a 4°C no decorrer do tempo. Em contraste, 18% de trealose + 3,5% de sorbitol resultou em uma perda de vetor adenoviral de apenas aproximadamente 30%.

#### **Exemplo 5 – Estabilidade física de adenovírus liofilizado**

[00185] Foi examinado o efeito de estresse mecânico, estresse de vibração repetida decorrente do transporte rodoviário e/ou aéreo, sobre a estabilidade das composições liofilizadas. Mais particularmente, a estabilidade física das composições no estado liofilizado foi testada após exposição ao estresse de sacudida.

[00186] Duas formulações foram preparadas, conforme previamente descrito, e testadas:

(1) Sacarose 18% + Sorbitol 3,5%

(2) Trealose 23%

[00187] Para cada condição de teste, dez frascos de vidro, quer siliconizados quer não siliconizados, contendo composições liofilizadas, foram presos com fita horizontalmente dentro de um recipiente, isolado, de peso leve (Sofribox) a 4°C. Três réplicas foram usadas para cada teste. As amostras foram sacudidas vigorosamente durante duas horas no ‘Nível 2’ seguido por mais duas horas no ‘Nível 1’ usando um Sistema de Teste de Vibração “Lansmont Model 1000”. O design experimental é pretendido para replicar o estresse de vibração encontrado durante duas horas de transporte rodoviário e duas horas de transporte aéreo, respectivamente.

[00188] Supõe-se que a vibração gradualmente fragmenta o bolo em

um pó dependendo da composição do bolo, e das intensidade e duração da vibração. A integridade física das composições liofilizadas foi determinada por análise visual usando “Axiovision” (CQR & Photo) nos tempos de 0, 2 horas e 4 horas (Figuras 20 e 21).

[00189] A Figura 20 mostra a proporção de amostras liofilizadas que permaneceram com aspecto intacto (O), com aspecto rachado (+) ou com aspecto fragmentado (X) após um transporte simulado de duas horas via transporte rodoviário e de duas horas via transporte aéreo. A formulação com 18% de trealose + 3,5% de sorbitol resultou em composições liofilizadas que foram menos afetadas pelo estresse vibracional do que as formulações com 23% de trealose. Uma temperatura de dessecação secundária de 15°C também resultou em composições liofilizadas que foram menos afetadas pelo estresse vibracional durante o transporte. A formulação com 18% de trealose + 3,5% de sorbitol, com temperatura de secagem secundária de 15°C e o uso de frascos siliconizados resultou nas melhores condições para manter intactos os bolos liofilizados.

[00190] A Figura 21 mostra a consistência de amostras liofilizadas que permaneceram com consistência não pulverulenta (O), com consistência muito pouco pulverulenta (+) ou com consistência muito pulverulenta (X) após um transporte simulado de duas horas de transporte rodoviário e de duas horas de transporte aéreo. A formulação com 18% de trealose + 3,5% de sorbitol resultou em composições liofilizadas que foram menos afetadas pelo estresse vibracional do que as formulações com 23% de trealose. Uma temperatura de dessecação secundária de 15°C também resultou em composições liofilizadas que foram menos afetadas pelo estresse vibracional durante o transporte. Quando formulado com 18% de trealose + 3,5% de sorbitol à temperatura de secagem secundária de 15°C, resultou em consistência menos pulverulenta do que à temperatura de secagem secundária de 25°C.

### REIVINDICAÇÕES

1. Composição, caracterizada pelo fato de que compreende um vetor adenoviral, sorbitol e um açúcar amorfo selecionado dentre trealose, sacarose, manose, manitol, rafinose, dextrana, e combinações dos mesmos.

2. Composição de acordo com a reivindicação 1, caracterizada pelo fato de que ser uma composição secada por congelamento.

3. Composição de acordo com a reivindicação 1 ou 2, caracterizada pelo fato de que a razão de sorbitol para o açúcar amorfo é menor que 4/14.

4. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a razão de sorbitol para o açúcar amorfo está entre 4/14 e 3/18, ou entre 4/14 e 3,5/16.

5. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que compreende, adicionalmente, sal, por exemplo, NaCl.

6. Composição secada por congelamento a partir de uma mistura aquosa, caracterizada pelo fato de que compreende um vetor adenoviral, sorbitol e um açúcar amorfo selecionado dentre trealose, sacarose, manose, manitol, rafinose, dextrana e combinações dos mesmos.

7. Composição de acordo com a reivindicação 6, caracterizada pelo fato de que a razão de sorbitol para o açúcar amorfo está entre 4/14 e 3/18, ou entre 4/14 e 3,5/16.

8. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 ou 7, caracterizada pelo fato de que a mistura aquosa tem uma concentração de NaCl abaixo de 25 mM, abaixo de 20 mM, abaixo de 15 mM, abaixo de 10 mM, ou, entre 2 e 10 mM.

9. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 8, caracterizada pelo fato de que a concentração de açúcar amorfo na mistura aquosa é abaixo de 18% (p/v).

10. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 9, caracterizada pelo fato de que a concentração de açúcar amorfo na mistura aquosa está entre 10 e 20% (p/v), ou, entre 14 e 18 % (p/v).

11. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 10, caracterizada pelo fato de que o açúcar amorfo é presente em uma quantidade correspondendo a uma concentração na mistura aquosa entre 10 e 20% (p/v), ou, entre 14 e 18 % (p/v).

12. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 11, caracterizada pelo fato de que a concentração de sorbitol na mistura aquosa está entre 3 e 4 % (p/v).

13. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 12, caracterizada pelo fato de que o sorbitol está presente em uma quantidade correspondendo a uma concentração de sorbitol na mistura aquosa entre 3 e 4% (p/v).

14. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações 6 a 13, caracterizada pelo fato de que o NaCl está presente em uma quantidade correspondendo a uma concentração na mistura aquosa entre 3 e 20 mM, entre 3 e 10 mM, ou, entre 4 e 6 mM.

15. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o outro açúcar amorfo é trealose ou sacarose.

16. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o outro açúcar amorfo é trealose.

17. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o vetor adenoviral é um adenovetor simiano, como um adenovetor de chimpanzé.

18. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o vetor adenoviral é

selecionado dentre ChAd3, ChAd63, ChAd83, ChAd155, ChAd157, Pan 5, Pan 6, Pan 7 ou Pan 9.

19. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o vetor adenoviral é selecionado dentre ChAd3, ChAd63, ChAd83, ChAd155, ChAd157, e PanAd3.

20. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que o vetor adenoviral é ChAd155.

21. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende, adicionalmente, um tensoativo, um agente tamponante e/ou um sal de metal bivalente.

22. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um tensoativo selecionado dentre tensoativos poloxâmero (por exemplo poloxâmero 188), tensoativos polissorbato (por exemplo polissorbato 80 e/ou polissorbato 20), tensoativos octoxinal, tensoativos polidocanol, tensoativos polioxil-estearato, tensoativos polioxil-óleo-de-rícino, tensoativos N-octil-glicosídeo, macrogol-15-hidroxi-estearato, e combinações dos mesmos.

23. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um tensoativo que é um tensoativo poloxâmero ou um tensoativo polissorbato.

24. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um tensoativo que é poloxâmero 188 ou polissorbato 80.

25. Composição de acordo com qualquer uma das

reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um tensoativo que é polissorbato 80.

26. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um agente tamponante selecionado dentre Tris, succinato, borato, Tris-maleato, lisina, histidina, glicina, glicilglicina, citrato, carbonato, fosfato ou combinação dos mesmos.

27. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um agente tamponante selecionado dentre Tris, succinato, borato ou combinação dos mesmos.

28. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende Tris.

29. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende um sal de íon de metal bivalente selecionado dentre  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$  ou  $\text{MgSO}_4$ .

30. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que a composição compreende  $\text{MgCl}_2$ .

31. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que é secada por congelamento e tem um teor de umidade de 1,40% (p/p) ou mais alto, como entre 1,40 e 10% (p/p).

32. Composição de acordo com qualquer uma das reivindicações anteriores, caracterizada pelo fato de que é para reidratação/reconstituição com água para injeção.

33. Kit, caracterizado pelo fato de que compreende dois

recipientes, sendo que um primeiro recipiente contém uma composição secada por congelamento, como definida em qualquer uma das reivindicações 1 a 32, e um segundo recipiente contém água para injeção.

34. Kit de acordo com a reivindicação anterior, caracterizado pelo fato de que o conteúdo do segundo recipiente é usado para reidratação/reconstituição do conteúdo do primeiro recipiente.

35. Mistura aquosa como definida em qualquer uma das reivindicações 6 a 32, caracterizada pelo fato de que é para secagem por congelamento.

36. Método para preparação da composição como definida em qualquer uma das reivindicações 32, caracterizado pelo fato de que compreende as etapas de secagem por congelamento da mistura aquosa por:

- a. congelamento da mistura aquosa incluindo uma etapa de recozimento, e
- b. secagem da mistura aquosa congelada sob pressão reduzida.

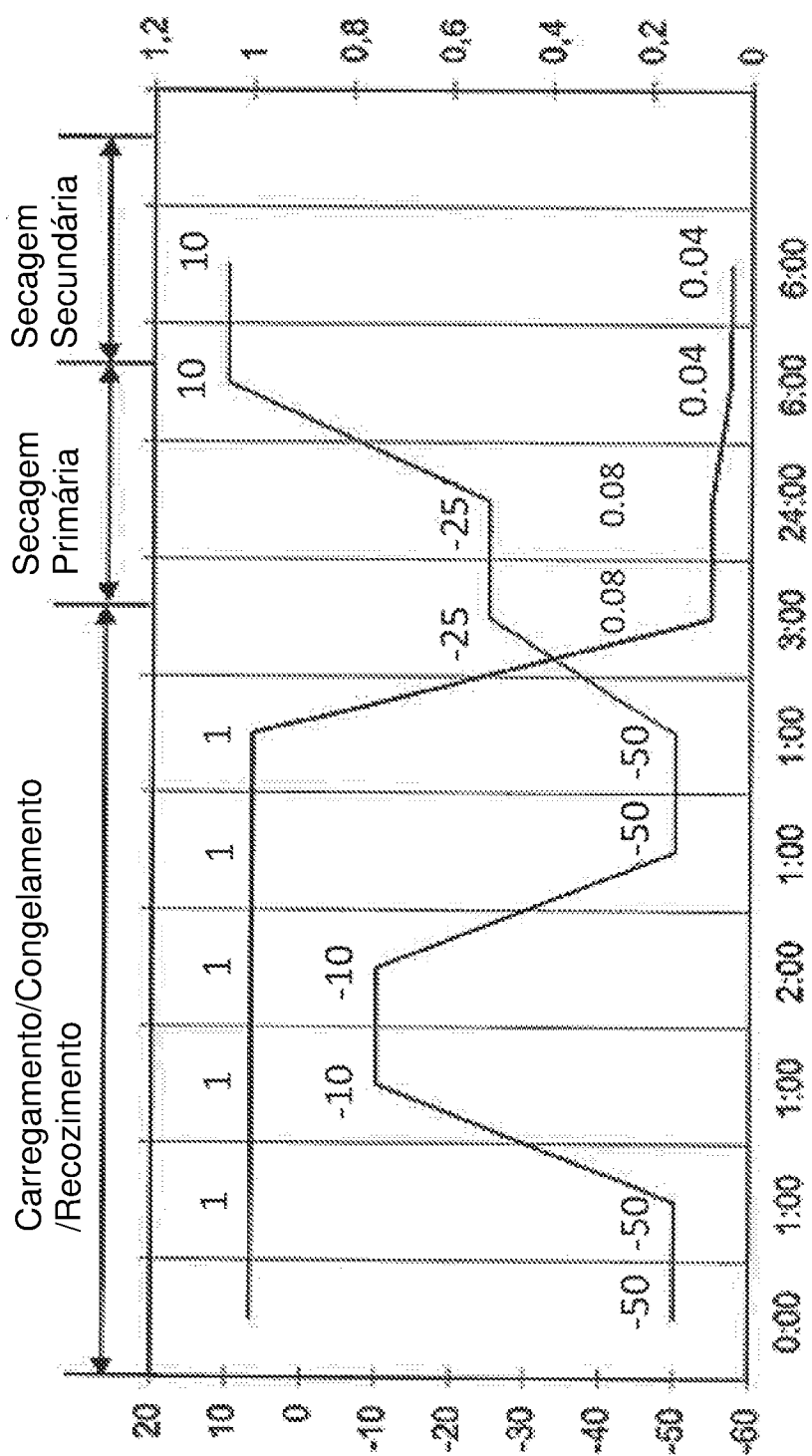


Figura 1



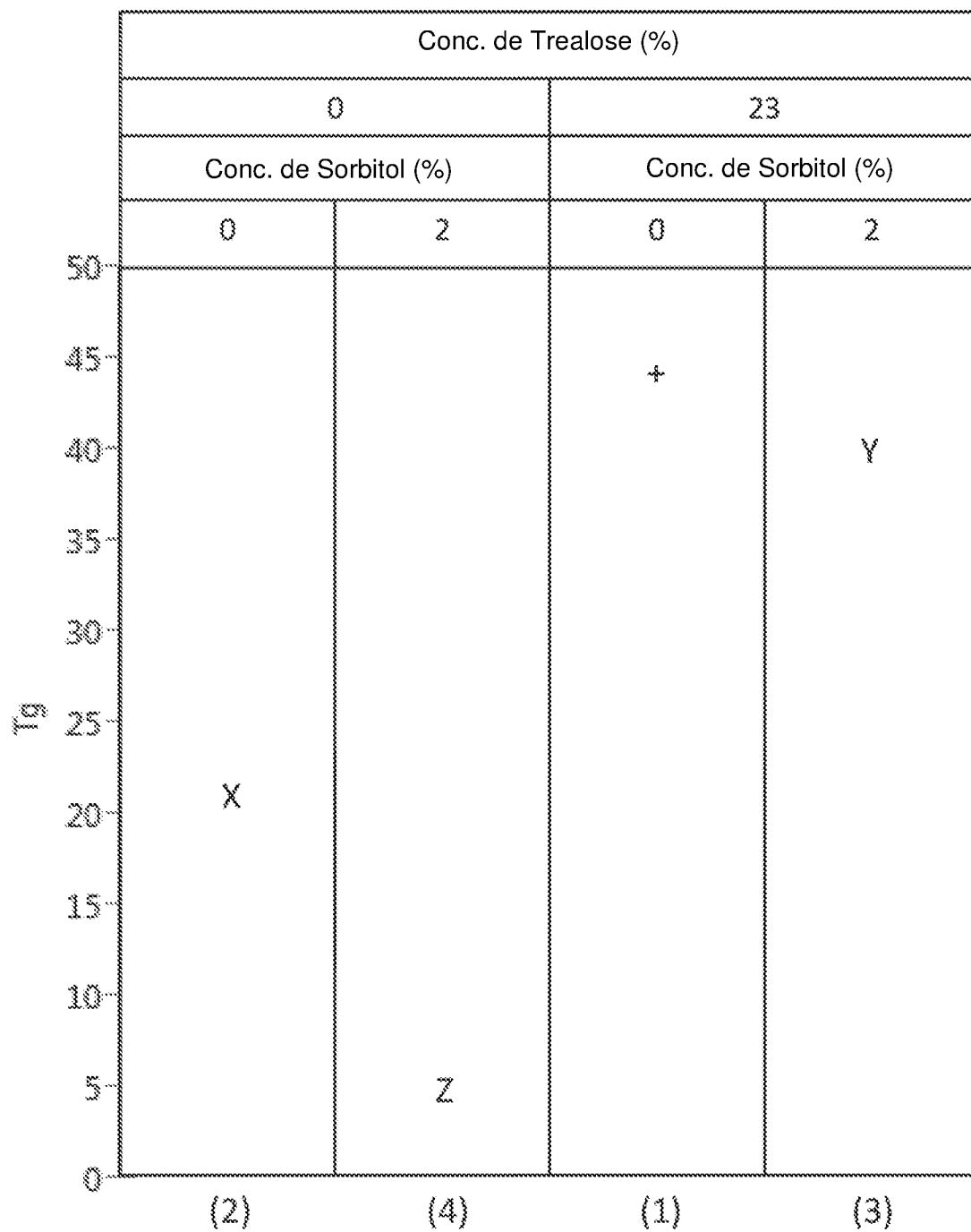


Figura 2

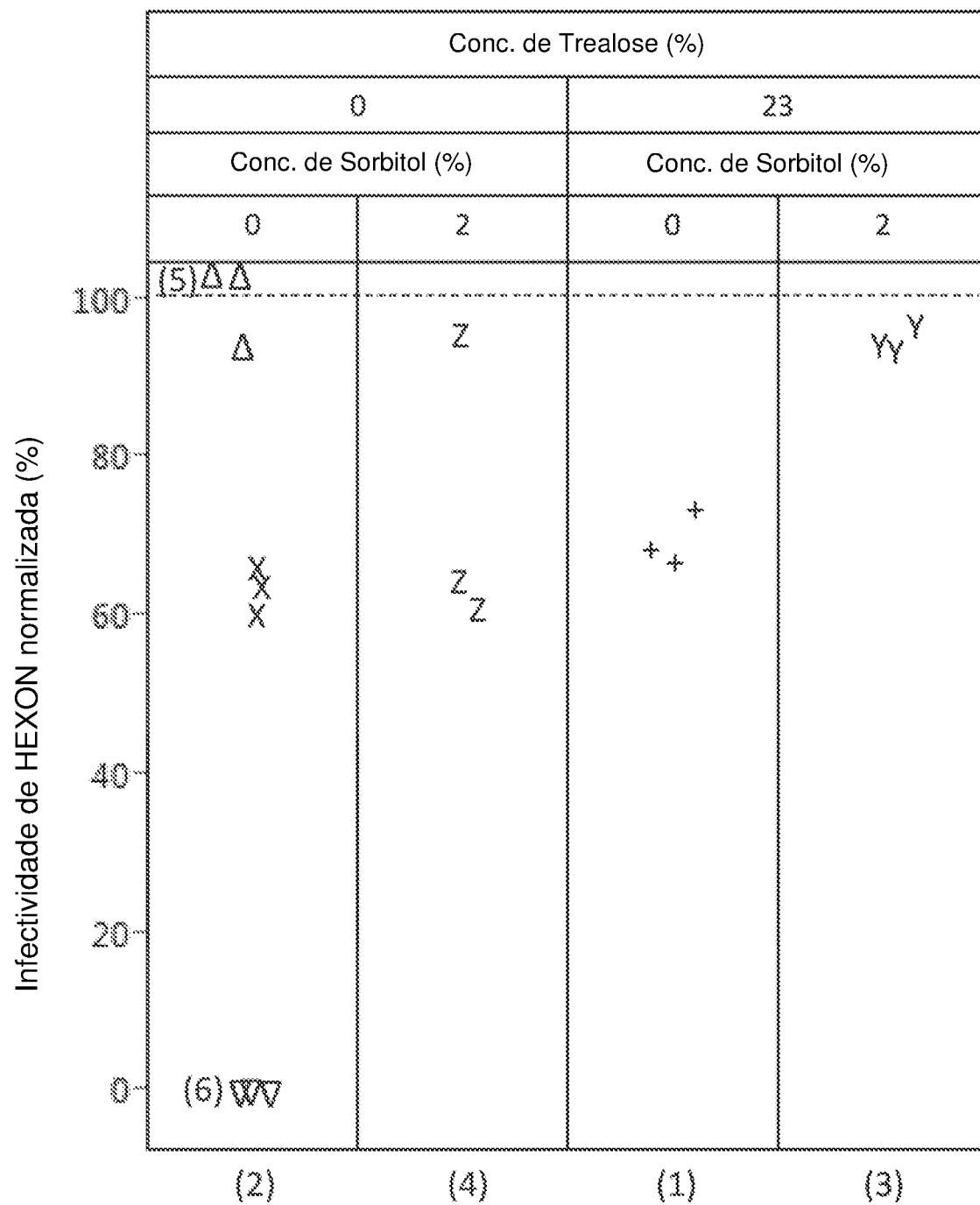


Figura 3

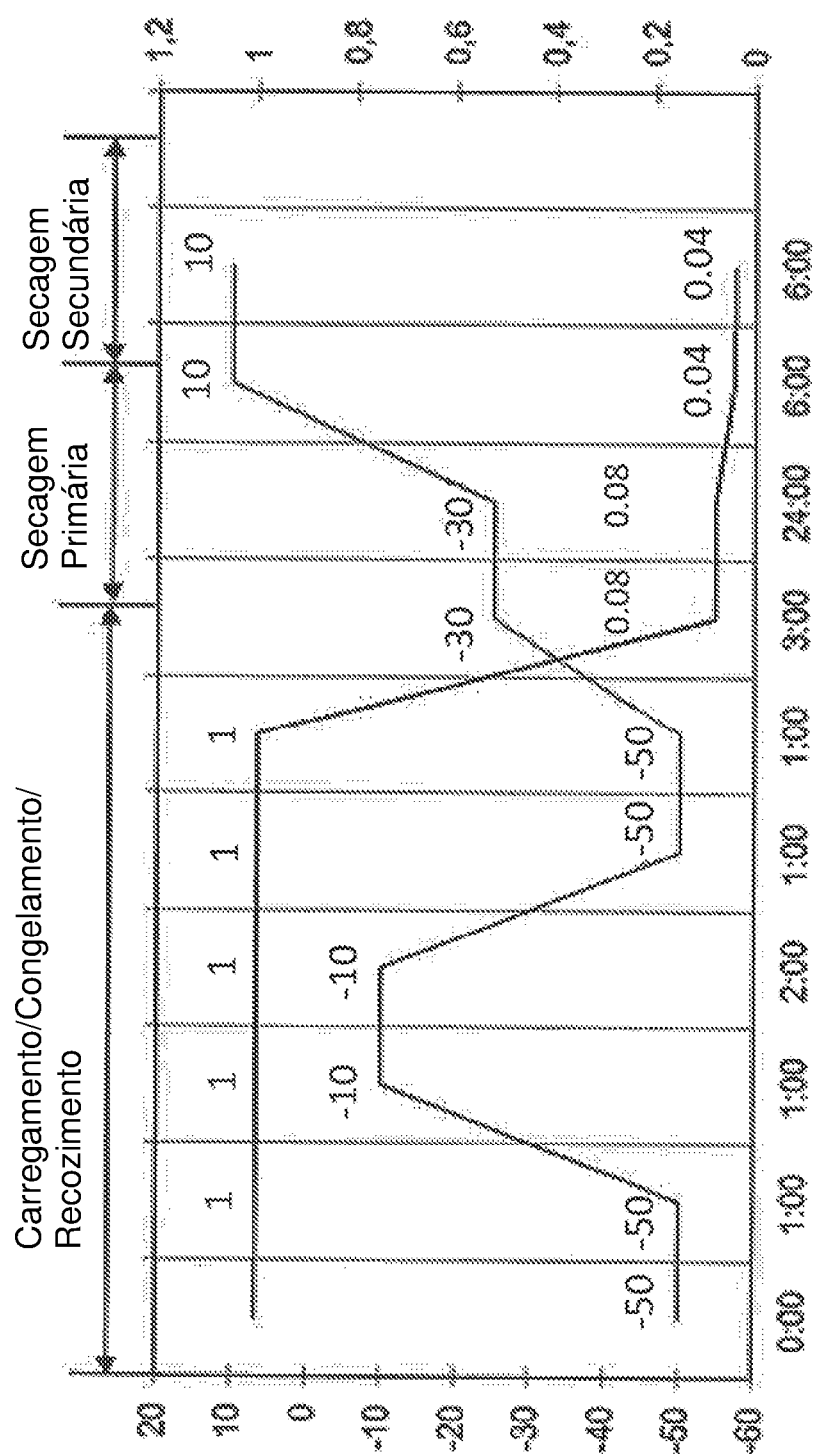


Figura 4

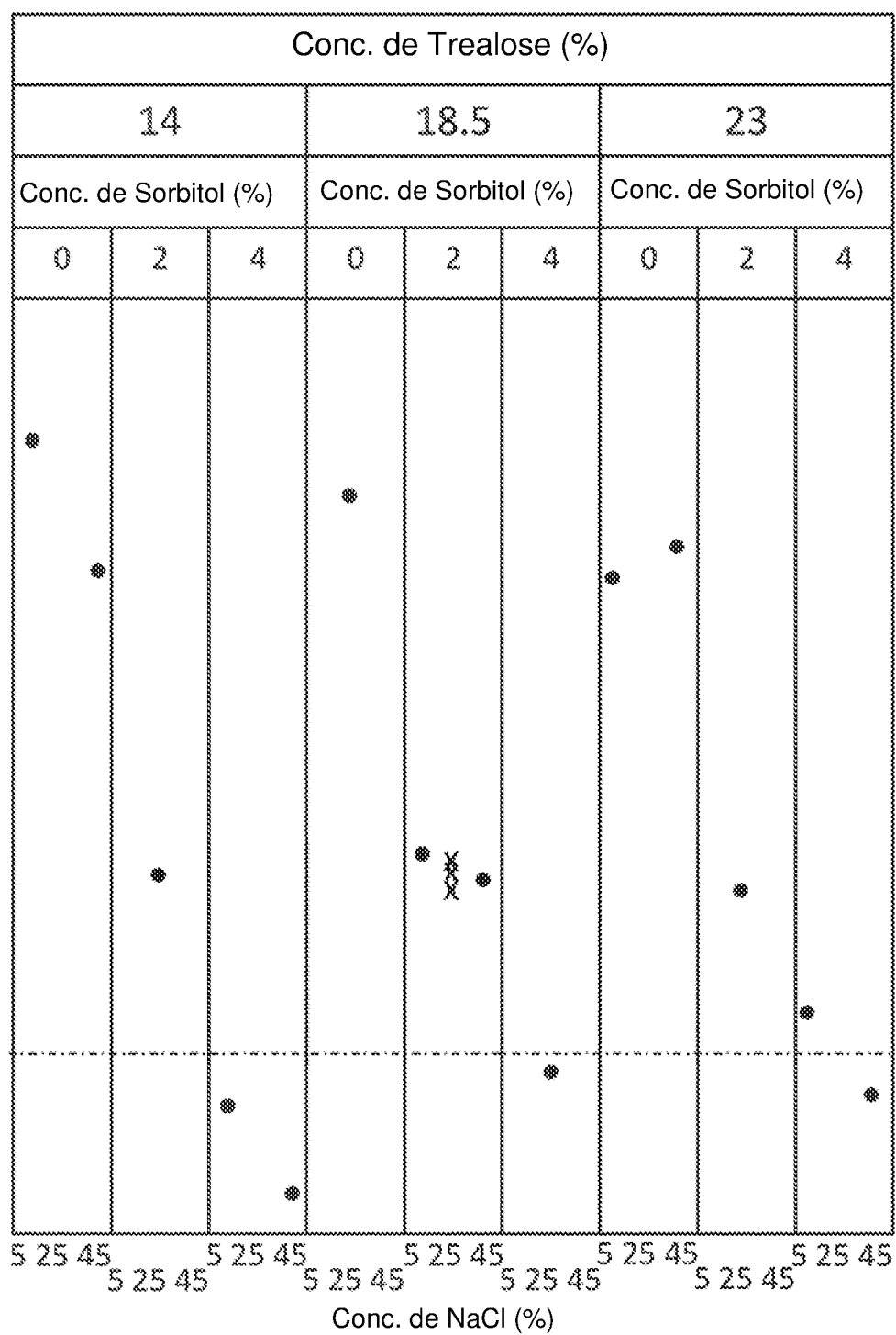


Figura 5

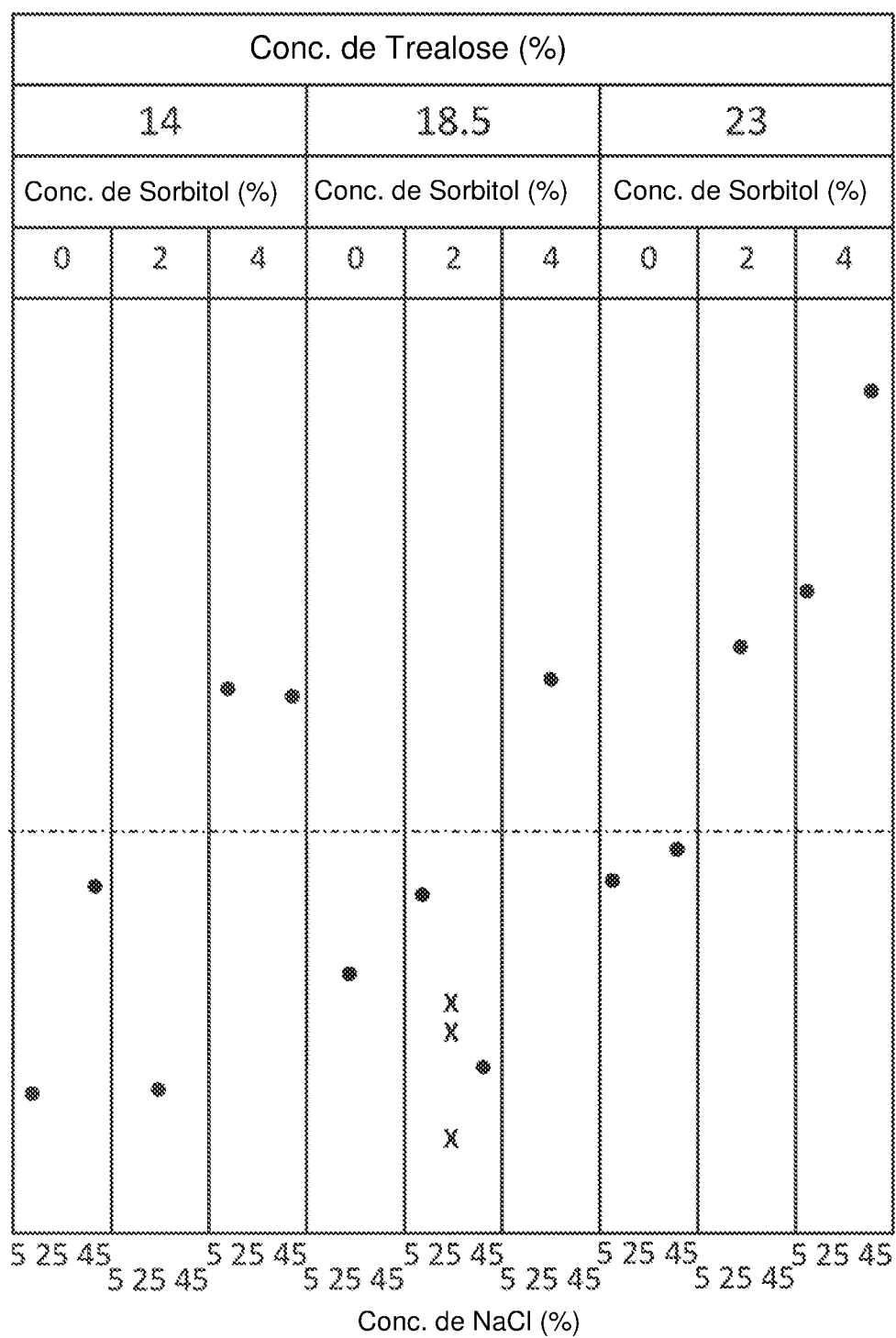


Figura 6

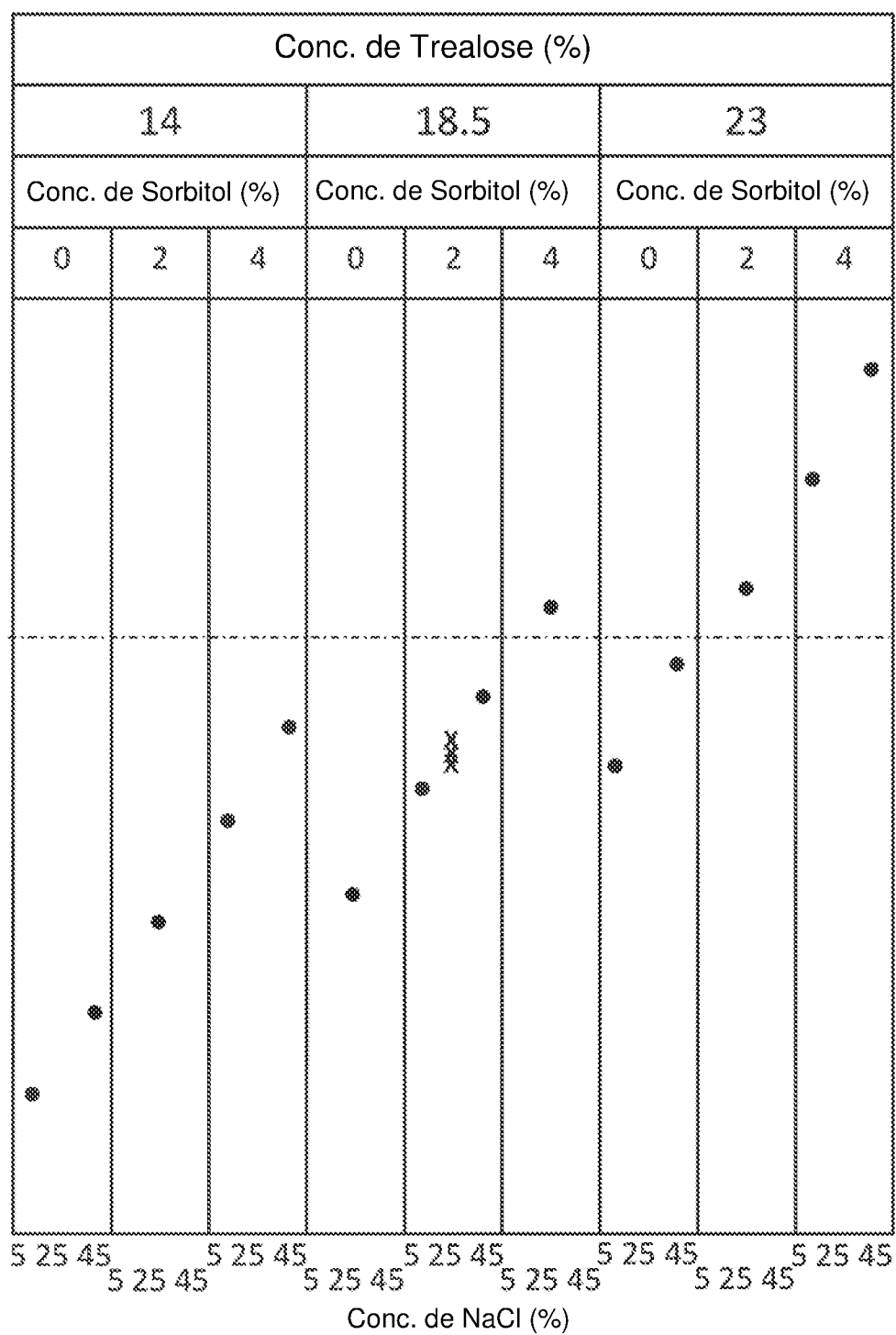


Figura 7

Figura 8  
PicoGreen normalizado - ADN livre (%) em função do Instante de Tempo

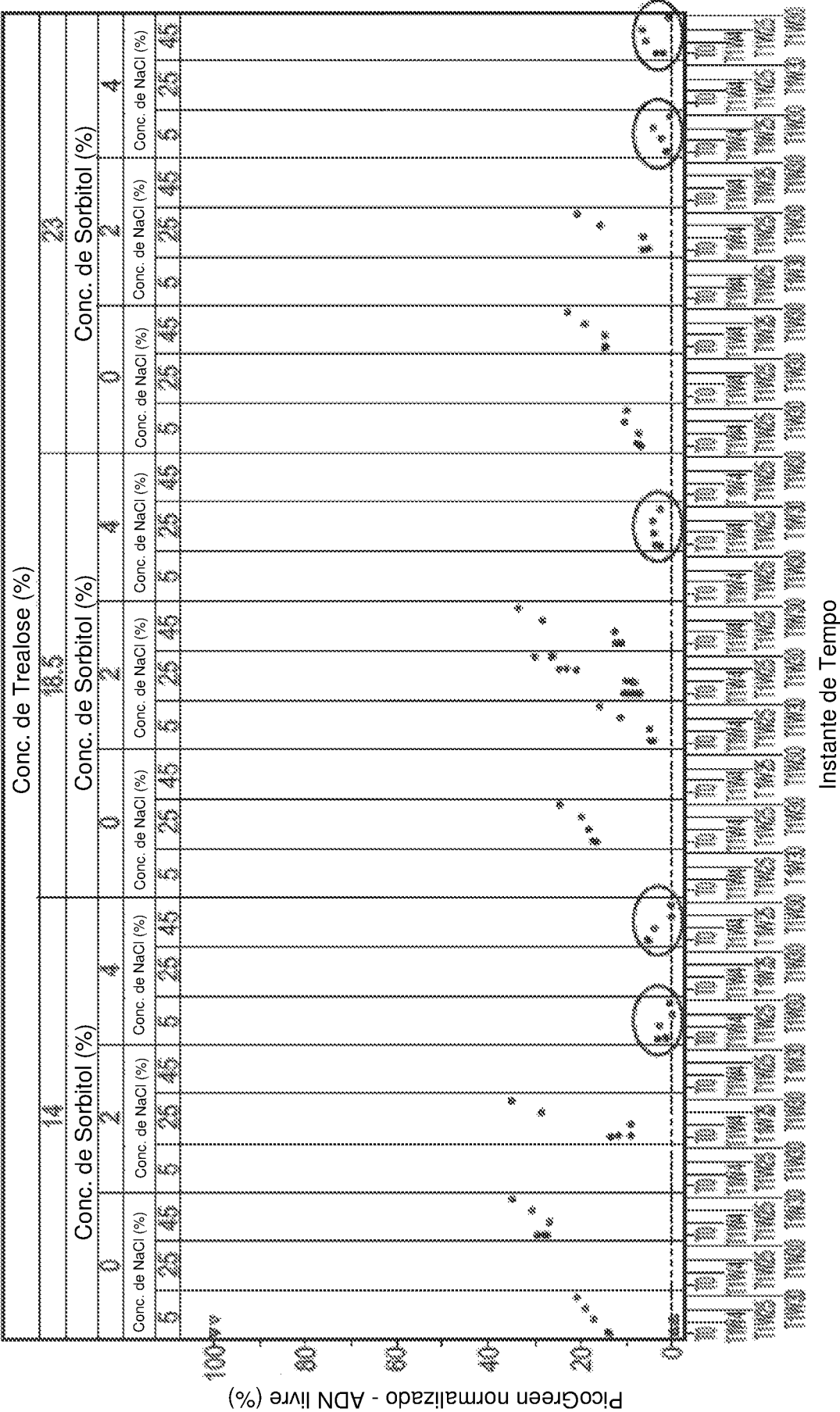


Figura 9  
Infectividade de HEXON normalizada (%) em função do Instante de tempo

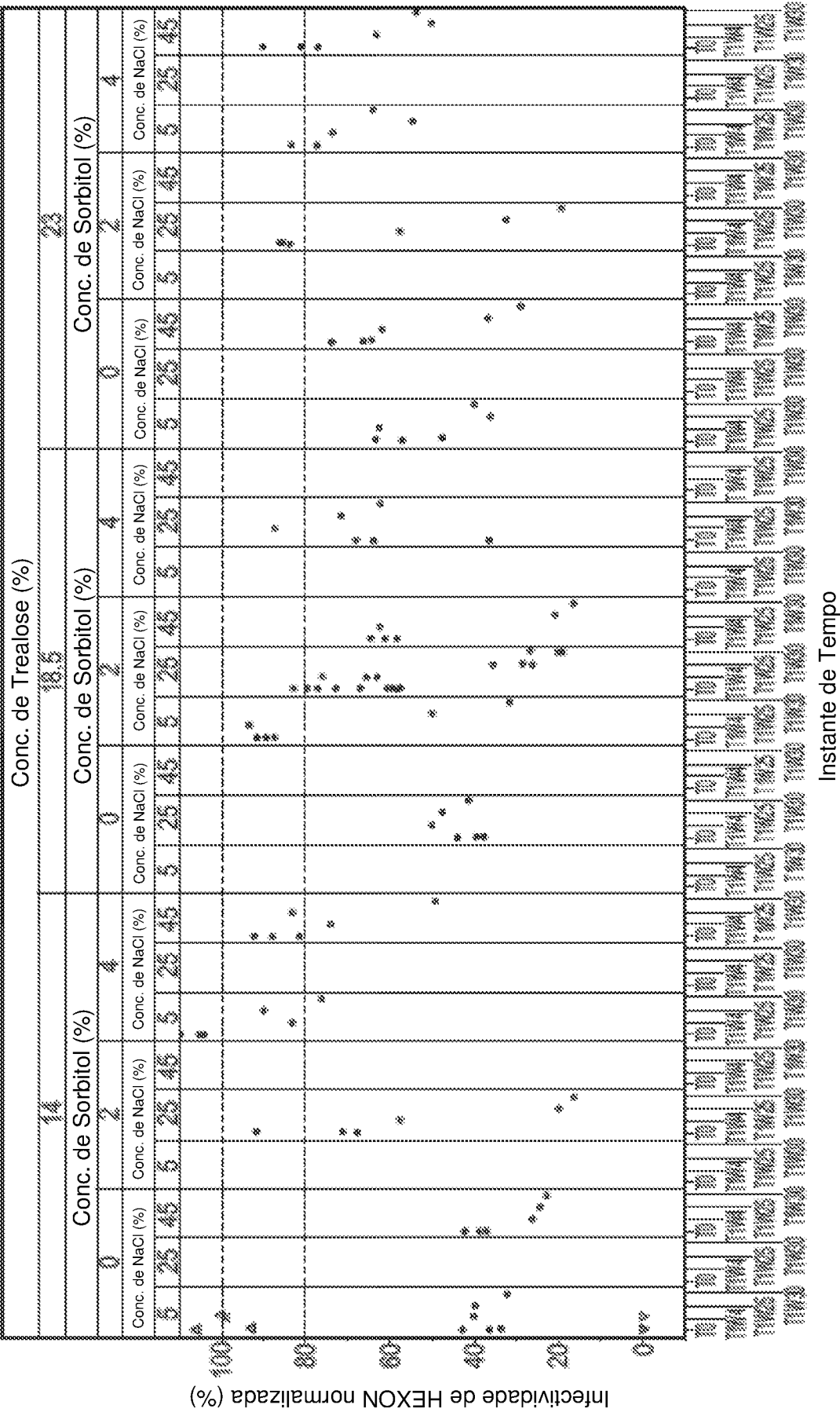
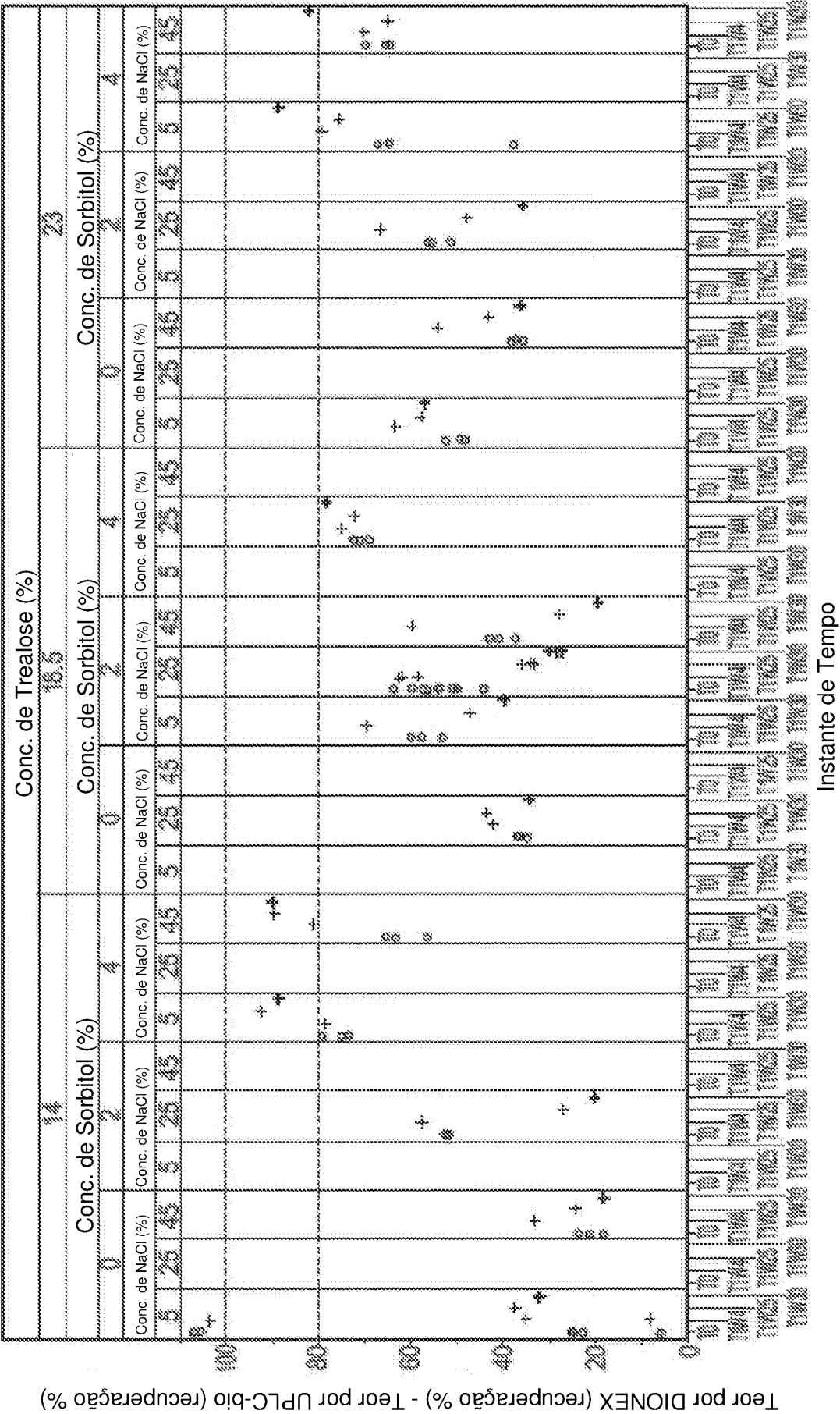




Figura 10

Teor por DIONEX (recuperação %) - Teor por UPLC-bio (recuperação %) em função do Instante de tempo



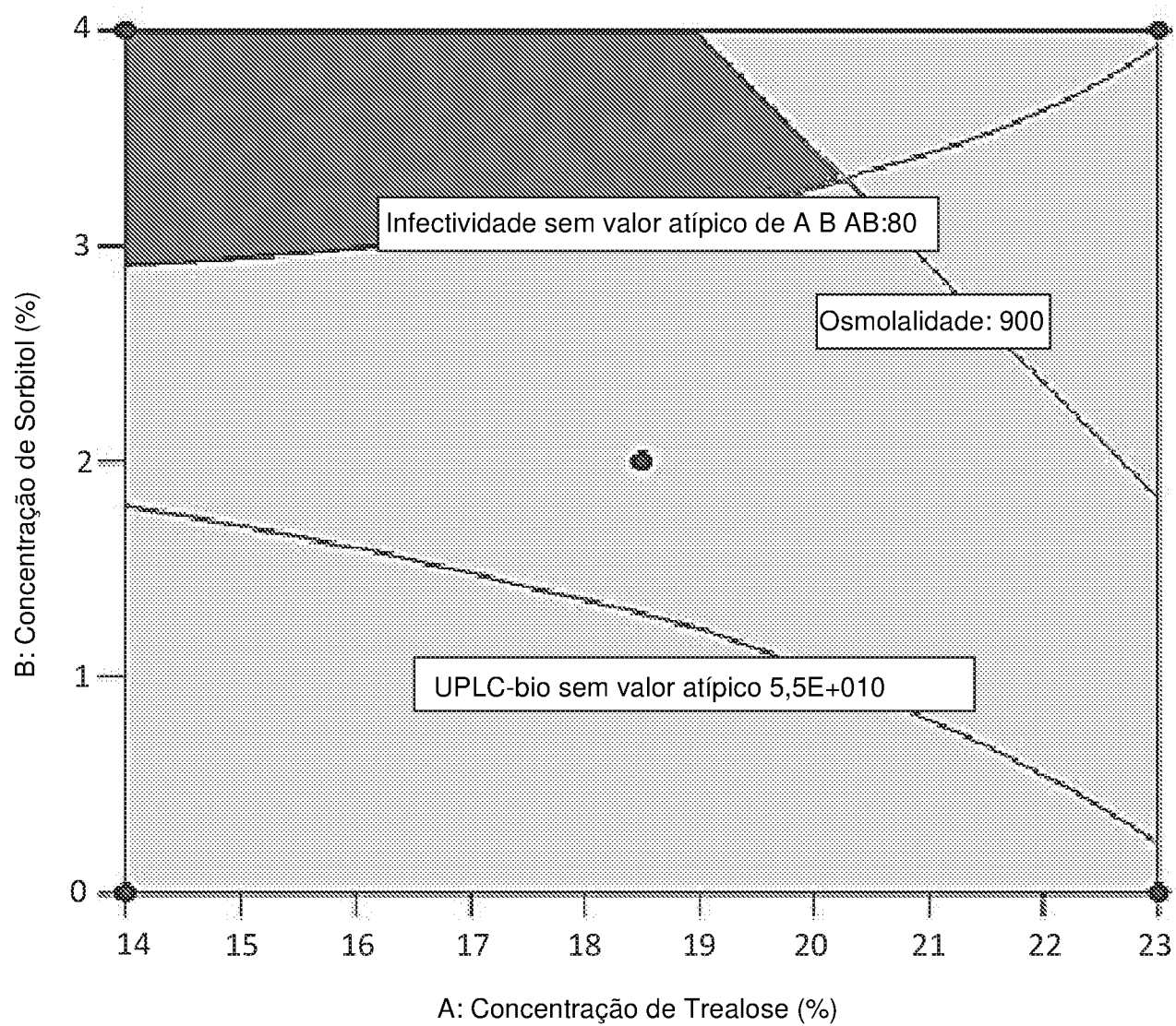


Figura 11

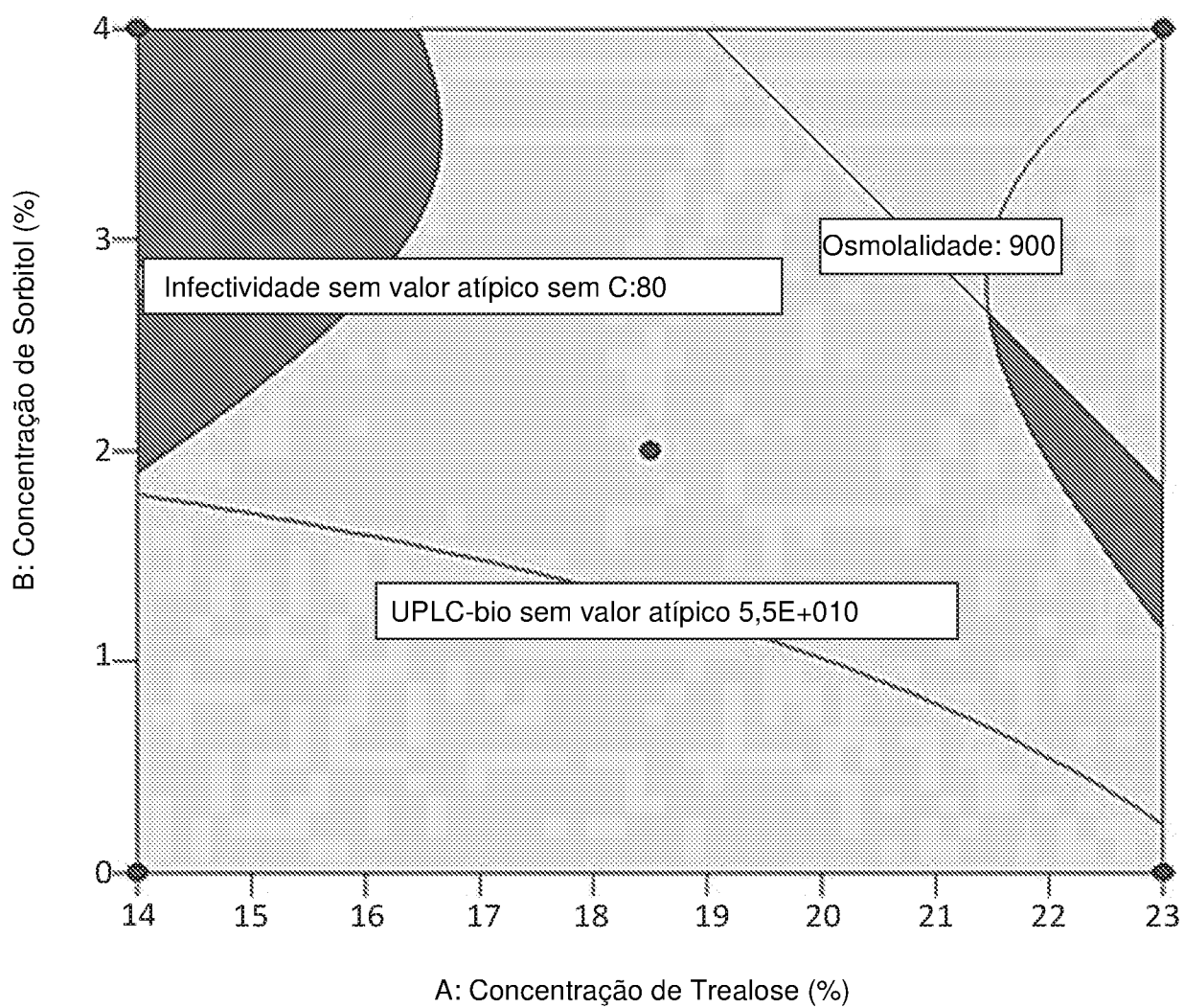


Figura 12

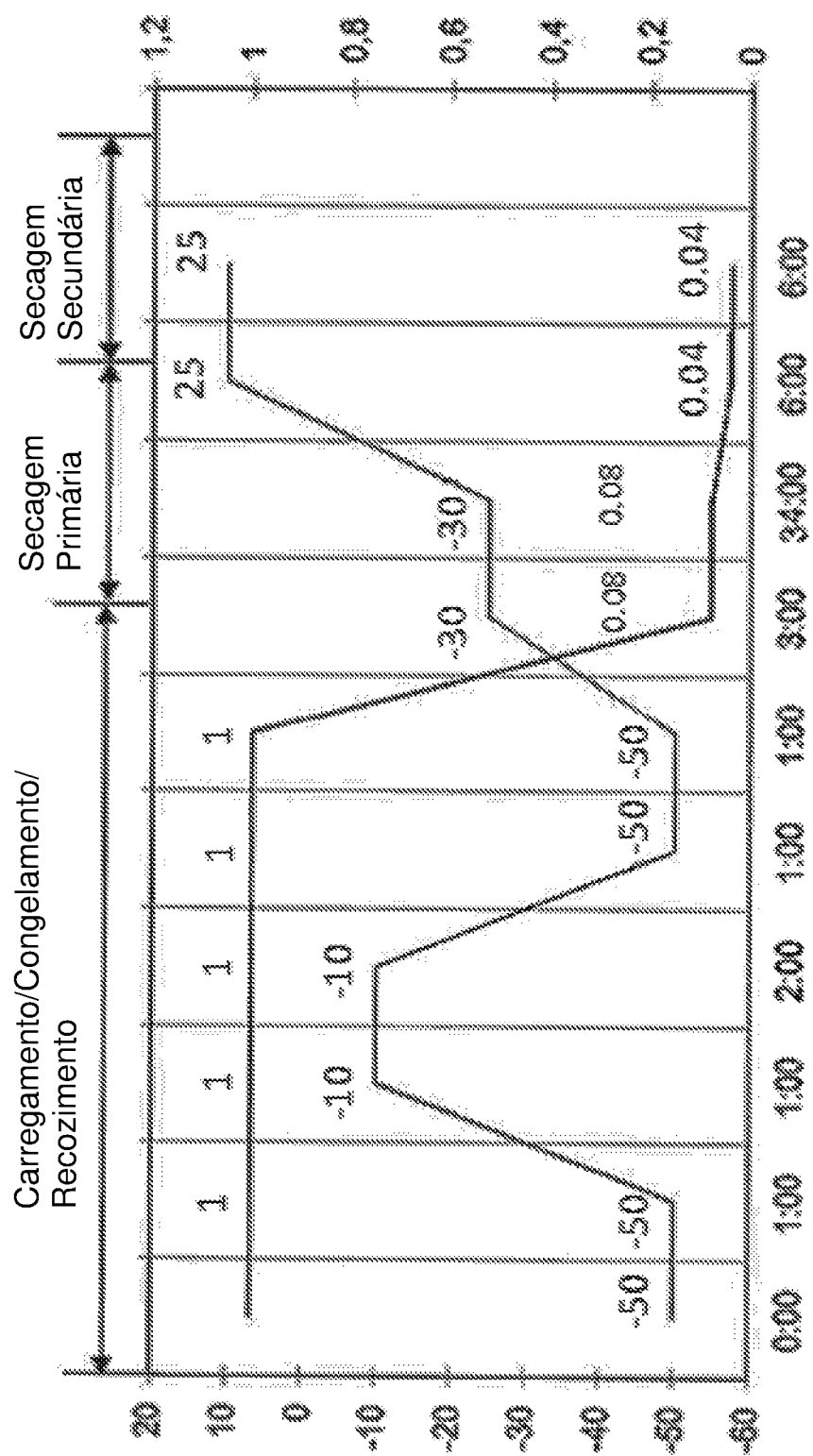


Figura 13

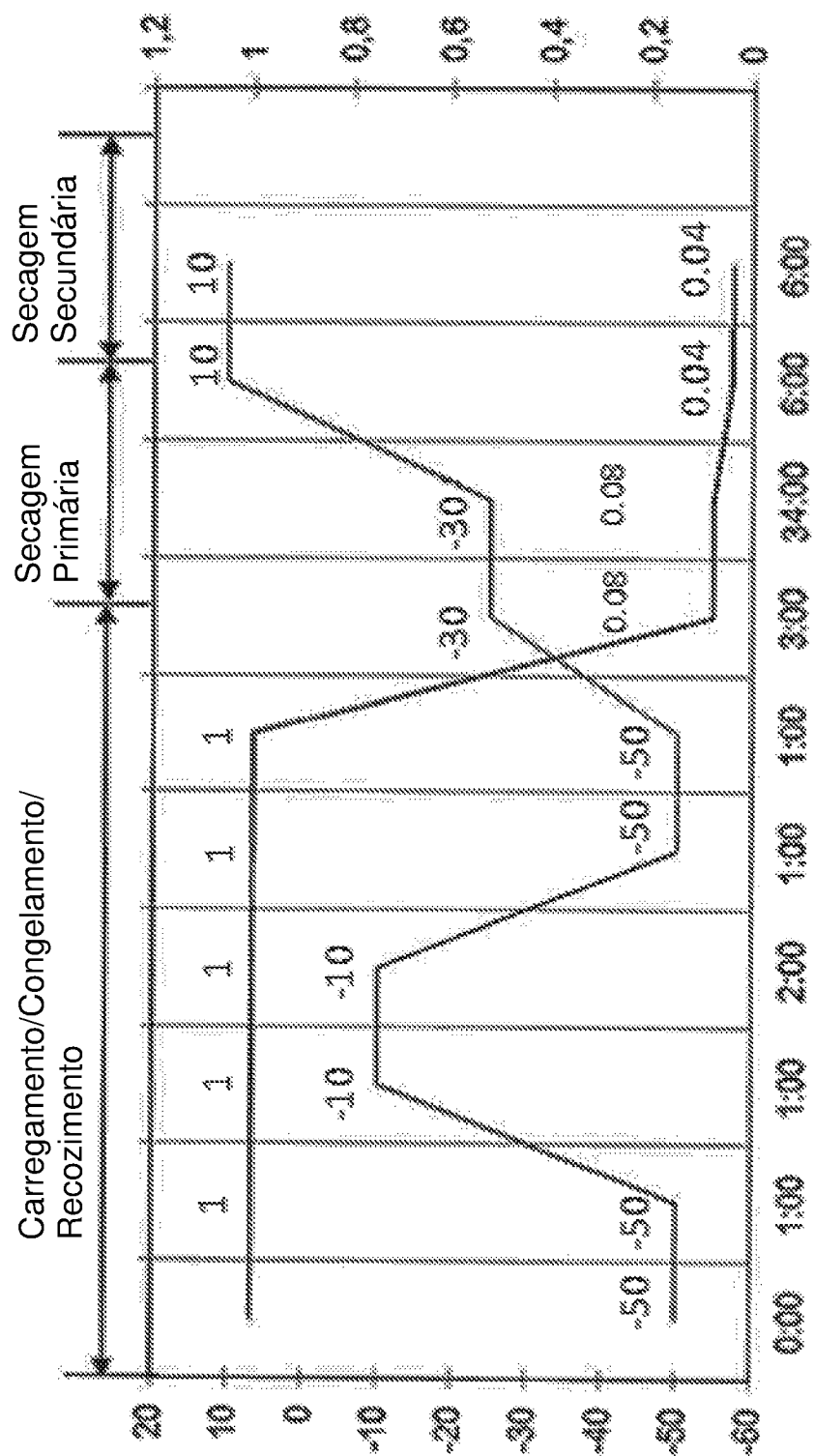


Figura 14

Figura 15  
PicoGreen normalizado - ADN livre (%) em função do Instante de Tempo

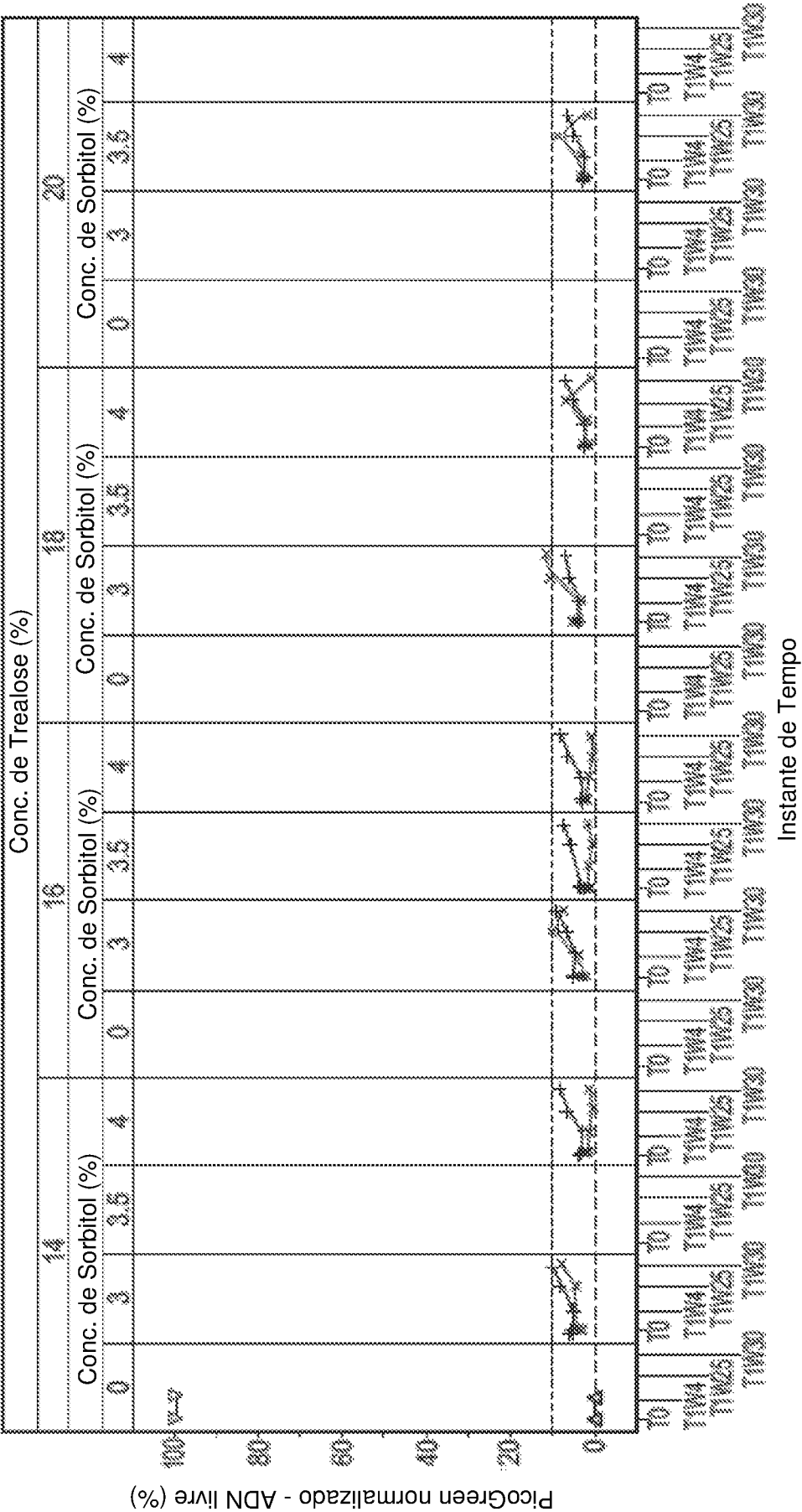


Figura 16

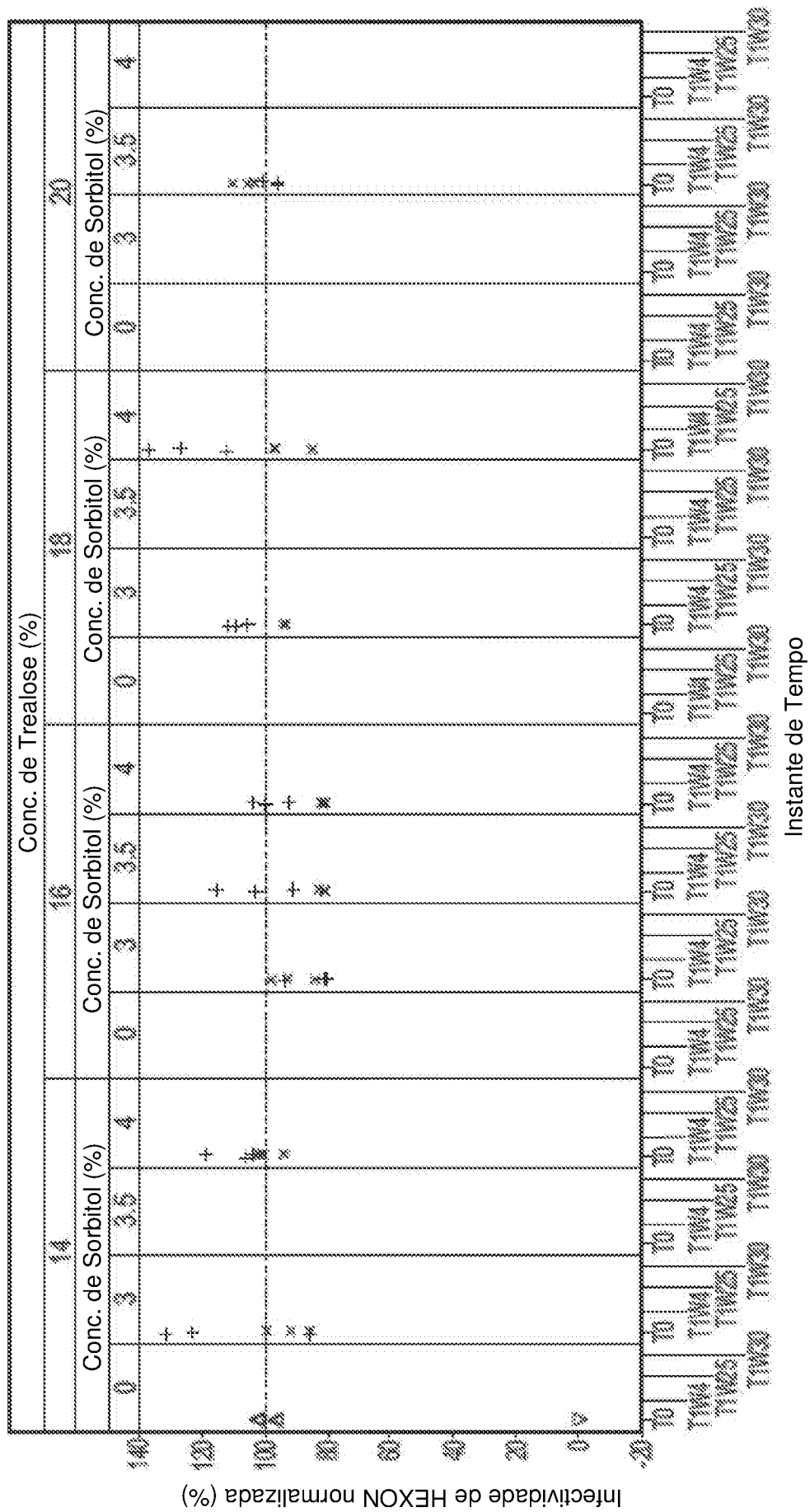
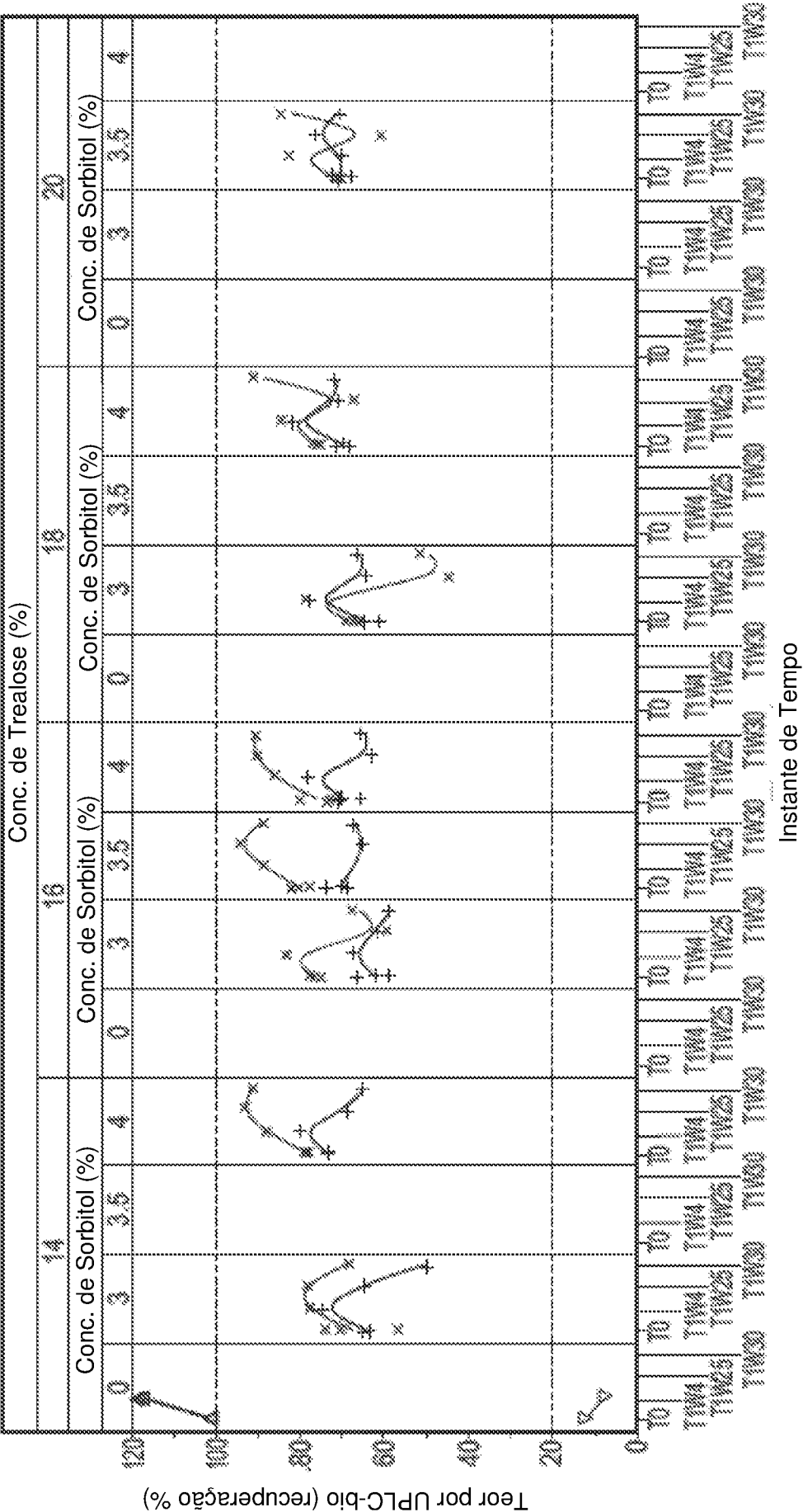


Figura 17  
Teor por UPLC-bio (recuperação %) em função do Instante de tempo





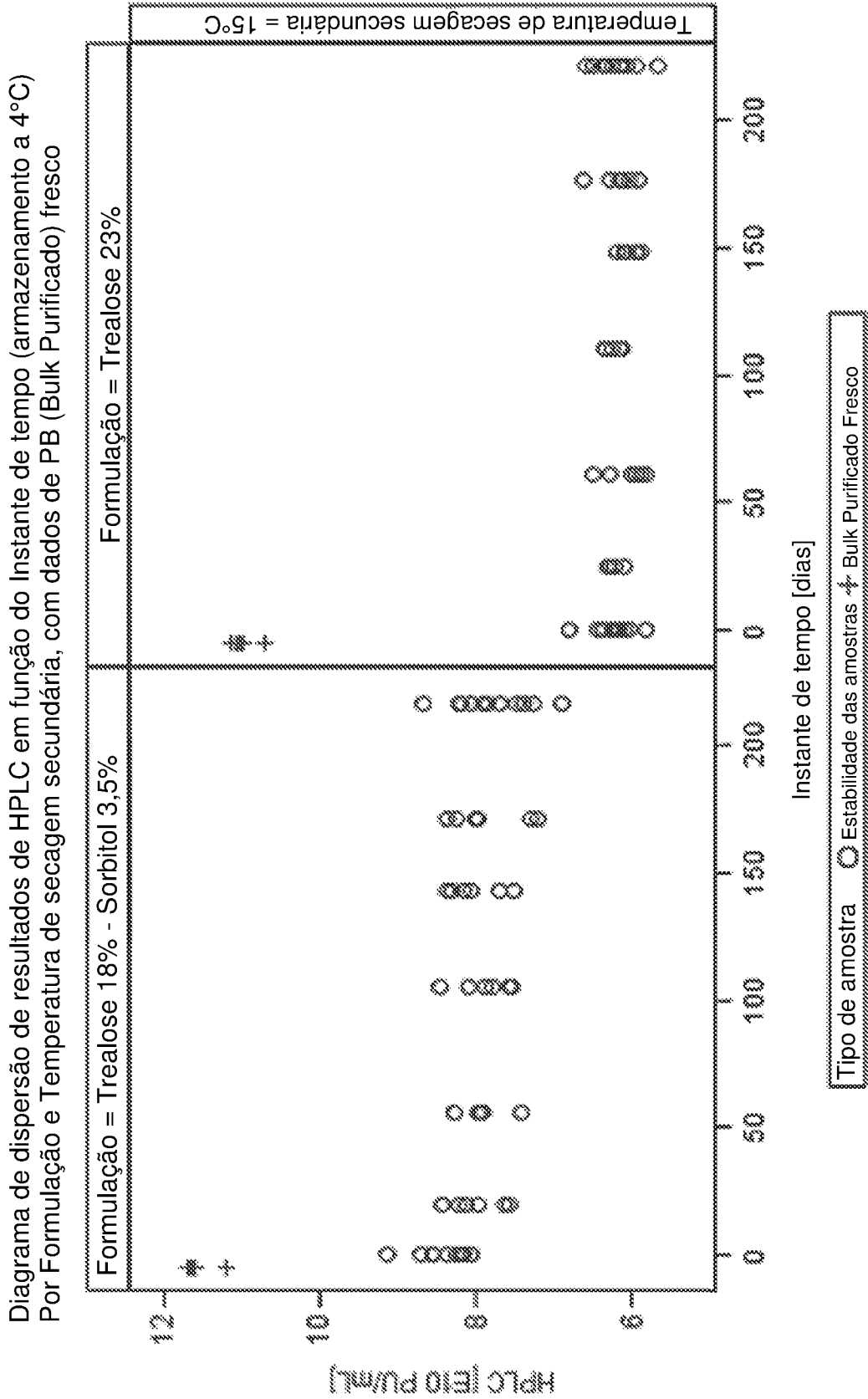


Figura 18

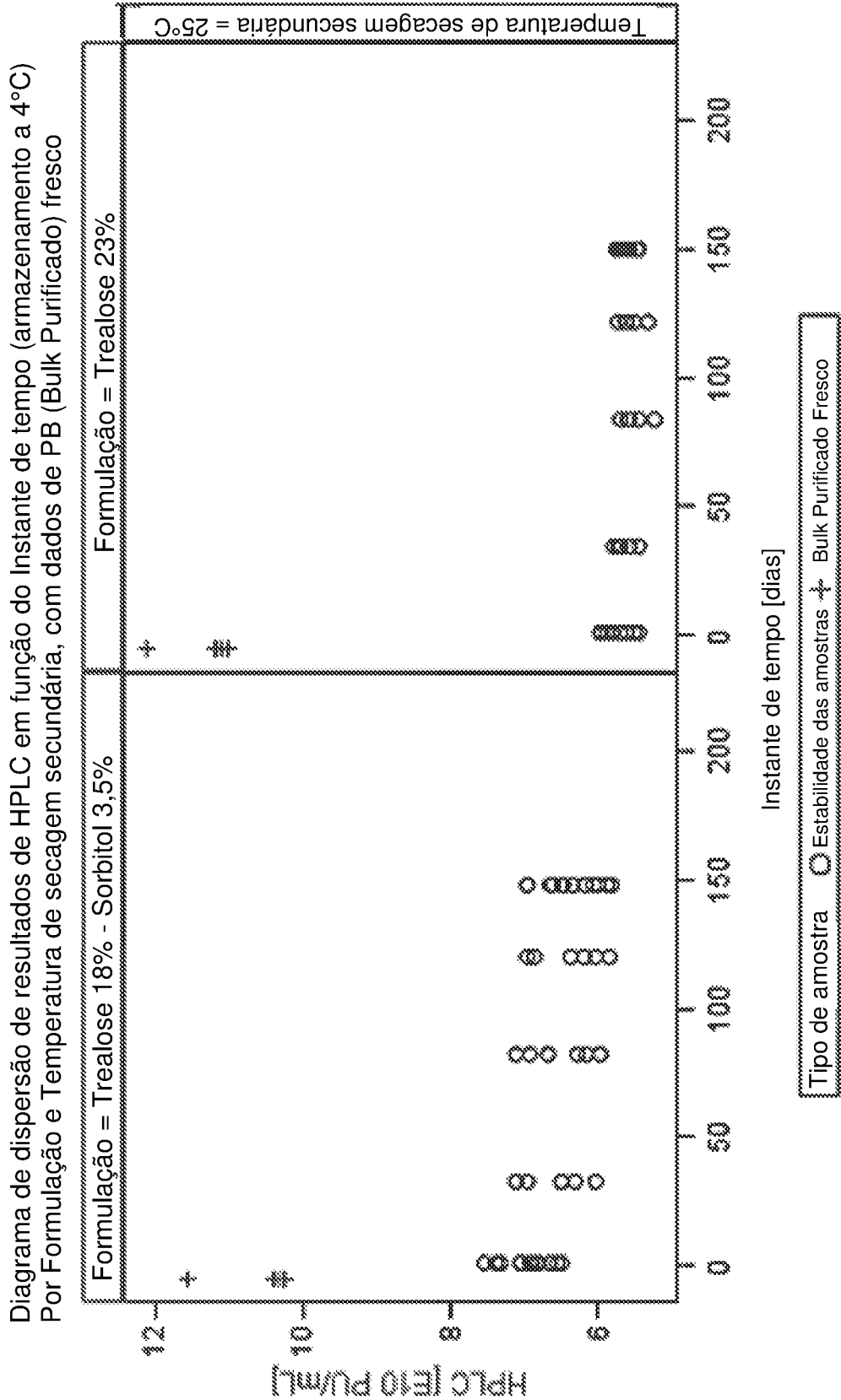


Figura 19

		ASPECTO					
		Formulação: T=18			Formulação: T=23		
Excedente	100 S-						
	50 S-						
	50 S+						
		15	25		15	25	
		Temperatura de Dessecação Secundária					

O= Aspecto Intacto

+ = Aspecto Rachado

X = Aspecto Fragmentado

Figura 20

CONSISTÊNCIA PULVERULENTA													
			Formulação: T=18						Formulação: T=23				
Excedente			100	S-	O O O O O O	+ + + + + +	O O O O O O	X X X X X X	X X X X X X	X X X X X X	O O O O O O	X X X X X X	X X X X X X
			50	S-	+ + + + + +	+ + + + + +	O O O O O O	O O O O O O	X X X X X X	O O O O O O	+ + + + + +	X X X X X X	X X X X X X
			50	S+	O O O O O O	X X X X X X	O O O O O O	X X X X X X	X X X X X X	+ + + + + +	X X X X X X	X X X X X X	X X X X X X
			15			25			15		25		
Temperatura de Dessecação Secundária													

O= Consistência Não Pulverulenta  
 += Consistência Muito Pouco Pulverulenta  
 X= Consistência Muito Pulverulenta

Figura 21

RESUMO

COMPOSIÇÃO, KIT, MISTURA AQUOSA, E, MÉTODO PARA  
PREPARAÇÃO DA COMPOSIÇÃO

A presente invenção refere-se à formulação de vetores adenovirais em composições contendo sorbitol em combinação com um outro açúcar amorfo, à sua formulação, e, também, a um método para obtenção de uma composição secada.