



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



Universitat Autònoma
de Barcelona

Departament de Bioquímica i Biologia molecular
Programa de Doctorat en Bioquímica, Biologia molecular i Biomedicina
Programa de Doctorat Industrial

**Desenvolupament d'una formulació i forma farmacèutica estable
per vectors adenovirals**

Tesi doctoral

Lluna M^a López Ortiz
Bellaterra, Abril 2018

Desenvolupament d'una formulació i forma farmacèutica estable per vectors adenovirals

Tesi doctoral presentada per **Lluna M^a López Ortiz**

Per obtenir el **Grau Doctoral en Biologia Molecular, Bioquímica i Biomedicina**

Aquest treball s'ha dut a terme als Laboratoris Reig Jofre i al Laboratori de Proteòmica CSIC/UAB sota la supervisió del Dr. Joaquim Abián Moñux i Dr. Francesc Xavier Avilés Puigvert.

Doctorand:

Director de tesi:

Lluna M^a López Ortiz

Joaquin Abián Moñux
Investigador científic del CSIC

Co-director de tesi:

Francesc Xavier Avilés Puigvert
Catedràtic del Departament de Bioquímica
i Biologia Molecular de l'IBB

Bellaterra, Abril 2018

El hombre se descubre cuando se mide con un obstáculo.

Antoine De Saint-Exupéry

AGRAÏMENTS

Als meus directors de tesi i tutor d'empresa, pel seu temps, els seus consells, el seu suport i la seva paciència, ja que el projecte ha tingut etapes complicades.

Al Departament de LP-CSIC/UAB, per la seva acollida, el seu suport i la seva comprensió.

A Reig Jofre, per haver-me concedit l'oportunitat d'aquesta experiència.

A la Generalitat de Catalunya per concedir-me l'ajut del Programa de Doctorat Industrial.

Part d'aquest treball ha estat finançat dins del Programa Retos de la Sociedad, en el marc del Plan Estatal de Investigación Científica y Técnica y de Innovación 2013-2016 dins del projecte Cure4B amb número d'expedient RTC-2015-4319-1.

A tothom que ha col·laborat en l'elaboració d'aquesta tesi, ja sigui amb el seu treball, el seu temps, la seva dedicació o els seus ànims.

A la meva família, per acompanyar-me i fer-me sentir tan afortunada.

Gràcies de tot cor

ÍNDEX

1.	INTRODUCCIÓ.....	11
1.1.	TERÀPIA GÈNICA.....	13
1.2.	ADENOVIRUS.....	14
1.2.1.	Ad5: Estructura i funcions	15
1.2.1.1.	<i>Hexon</i>	15
1.2.1.2.	Complex <i>penton: penton base i fiber</i>	17
1.2.1.3.	Proteïnes estructurals minoritàries: IIIa, VI, VIII i IX.....	20
1.2.1.4.	Proteïnes del nucli víric: V, VII, Mu, IVa2, la proteïna terminal (TP) i la proteasa vírica	21
1.3.	LIOFILITZACIÓ	22
1.3.1.	Congelació	24
1.3.2.	Assecat primari	25
1.3.3.	Assecat secundari.....	27
1.4.	ESTABILITAT DELS ADENOVIRUS	28
1.4.1.	Revisió de formulacions estables d'adenovirus.....	30
1.4.2.	Mecanismes estabilitzadors de les proteïnes.....	35
1.4.3.	Factors involucrats amb l'estabilitat de l'Ad5.....	36
1.4.3.1.	Temperatura	37
1.4.3.2.	pH.....	38
1.4.3.3.	Força iònica.....	40
1.4.3.4.	Oxidació per radicals lliures	40
1.4.3.5.	Estrès per la congelació/descongelació.....	41
1.4.3.6.	Velocitat congelació.....	41
1.4.3.7.	Efecte de la concentració de soluts	42
1.4.3.8.	Formació d'interfícies gel-aigua	42
1.4.3.9.	Adsorció a superfícies	42

1.4.3.10.	Deshidratació	43
1.4.3.11.	Agregació de proteïnes.....	44
1.4.3.12.	Degradacions químiques	45
1.4.3.13.	Temperatura d'emmagatzematge.....	45
1.4.3.14.	Humitat.....	46
1.4.3.15.	Medi de reconstitució.....	46
1.5.	DISSENY D'UNA FORMULACIÓ D'ADENOVIRUS	47
1.5.1.	Selecció d'excipients	47
1.5.1.1.	Tampons.....	49
1.5.1.2.	Sucres i poliols	49
1.5.1.3.	Agent de càrrega	51
1.5.1.4.	Polímers	52
1.5.1.5.	Surfactants.....	53
1.5.1.6.	Ions metàl·lics	53
1.5.1.7.	Agents ajustadors de tonicitat	54
1.6.	SELECCIÓ DE L'ENVÀS PRIMARI: el vial i el tap.....	54
2.	OBJECTIU	57
3.	MATERIAL I MÈTODES	59
3.1.	PRODUCCIÓ DELS ESTOCS VÍRICS D'AD5.....	61
3.1.1.	Amplificació del vector recombinant d'Ad5	61
3.1.2.	Purificació del vector recombinant d'Ad5.....	61
3.2.	CARACTERITZACIÓ DELS ESTOCS VÍRICS.....	62
3.2.1.	Concentració de partícules víriques (pv/mL) per espectrofotometria - Títol físic	62
3.2.3.	Estrès per congelació-descongelació	64
3.3.	LIOFILITZACIÓ	64
3.3.1.	Lots d'excipients.....	65

3.3.2.	Lots d'Ad5	65
3.4.	CARACTERITZACIÓ TÈRMICA DE LA SOLUCIÓ D'EXCIPIENTS	66
3.4.1.	Calorimetria diferencial d'escombratge (DSC)	66
3.4.2.	Microscòpia de liofilització (FDM)	67
3.5.	ESTUDIS D'ESTABILITAT	67
3.5.1.	Estudis d'estabilitat en solució	67
3.5.2.	Estudis d'estabilitat del liofilitzat a curt i llarg termini	67
3.6.	CARACTERITZACIÓ DELS LOTS	68
3.6.1.	Aparença	68
3.6.2.	Temps de reconstitució	69
3.6.3.	pH	69
3.6.4.	Agregació per Dynamic Light Scattering (DLS)	69
3.6.5.	Humitat residual mitjançant Karl Fischer coulomètric injectat	69
3.6.6.	Concentració de partícules víriques (pv/mL) per espectrofotometria - Títol físic	70
3.6.7.	Concentració de partícules víriques infeccioses (UI/mL) utilitzant una tinció anti-Ad/hexon - Títol funcional	70
3.7.	FRACCIONAMENT PER DENSITAT DELS ESTOCS VÍRICS	71
3.8.	SDS-PAGE	71
3.9.	DIGESTIÓ FASP (<i>Filter-aided sample preparation</i>)	72
3.10.	DESSALAT: columnes en puntes C18	72
3.11.	STACKING DE PROTEÏNES	73
3.12.	DIGESTIÓ PROTEICA EN GEL D'ACRILAMIDA	73
3.13.	IDENTIFICACIÓ PROTEICA: NANOLC-MS/MS	73
3.14.	MICROSCÒPIA DE TRANSMISSIÓ ELECTRÒNICA (TEM)	74
4.	RESULTATS I DISCUSSIÓ	75
4.1.	GARBELLAT INICIAL DE FORMULACIONS	77

4.2.	AVALUACIÓ DE L'EFICÀCIA PROTECTORA DE LES FORMULACIONS SELECCIONADES	82
4.3.	SUBSTITUCIÓ DE LA INULINA PER LA SACAROSA I ADDICIÓ D'ALBÚMINA	84
4.4.	ESTUDI DE BIOCOMPATIBILITAT DE L'ENVÀS PRIMARI.....	89
4.5.	CANVI DE CONCENTRACIÓ VÍRICA AL LOT DE 1E11 pv/mL a 1E12 pv/mL	91
4.6.	ESTUDI DE L'IMPACTE DE pH EN L'ESTABILITAT DE L'AD5	92
4.6.1.	Estudi de l'impacte del rang de pH òptim per Ad5	93
4.7.	AVALUACIÓ DE L'IMPACTE FUNCIONAL DEL pH 8.5.....	99
4.8.	APROXIMACIÓ INICIAL DE L'OPTIMITZACIÓ DE L'ASSECAT SECUNDARI.....	104
4.8.1.	Selecció d'extraccions a un assecat secundari de 10°C i 30°C	104
4.8.3.	Avaluació de l'estabilitat de l'Ad5 amb els cicles de liofilització proposats	107
4.9.	ESTUDI D'ESTABILITAT A LLARG TERMINI.....	110
4.10.	ESTUDI DE L'IMPACTE DE pH A NIVELL PROTEIC.....	113
4.10.1.	Fraccionament per densitat dels estocs vírics	113
4.10.2.	Anàlisi SDS-PAGE de les fraccions	116
4.10.3.	Identificació proteica de les fraccions: nanoLC-MS/MS.....	118
4.10.4.	TEM de l'Ad5	123
5.	CONCLUSIONS	129
6.	BIBLIOGRAFIA	133
7.	ANNEXES	149

ABREVIATURES I ACRÒNIMS

AAV	Adeno-associated virus
ACN	Acetonitril
Ad5	Adenovirus type 5
Ad2	Adenovirus type 2
ADV	Adenovirus
ARM	Adenovirus reference material
ARMWG	Adenovirus reference material working group
ATCC	American type culture collection
CAR	Coxsackievirus and adenovirus receptor
CID	Collision-induced dissociation
CV	Coeficient de variació
DAB	3, 3 -diaminobenzidine
DLS	Dynamic light scattering
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DNA	Desoxirribonucleic acid
DSC	Differential scanning calorimetry
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FA	Formic acid
FASP	Filter-aided sample preparation
FBS	Fetal bovine serum
FDA	Food and drug administration
FDM	Freeze-dry microscopy
GON	Group of nine
GOS	Group of six
HAdV	Human adenovirus
HSA	Human serum albumin
HSV	Herpes simplex virus
HVR	Hipervariable region
IAA	Iodoacetamide

LC-MS/MS	Liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry
MTOC	Microtubule organizing center
OD	Optical density
PBS	Phosphate buffered saline
pdi	Polidispersion index
PS	Polisorbat
PSM	Peptide spectrum match
pv	Partícules víriques
PVDF	Polyvinylidene fluoride
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TEM	Transmission electron microscopy
Tc	Temperatura de col·lapse
Te	Temperatura eutèctica
Tg	Temperatura de transició vítre del liofilitzat
Tg'	Temperatura de transició vítre de la solució
Tris	tris(hidroximetil)aminometà
UI	Unitats infectives
% p/p	% pes/pes
% p/v	% pes/volum
% v/v	% volum/volum

RESUM

Els vectors adenovirals estan lluny de ser establerts com a pràctica habitual en teràpia gènica degut a la dificultat de preservar la seva activitat en unes condicions òptimes pel transport i l'administració. Actualment, l'estabilització dels adenovirus a llarg termini requereix de la presència de glicerol a una temperatura de -80°C . Aquesta temperatura d'ultra-congelació genera importants inconvenients a nivell d'emmagatzematge, transport i pràctica clínica. I per altra banda, la presència de glicerol requereix d'una extensa dilució abans de l'administració per reduir els efectes tòxics. Així doncs, la millora de la termoestabilitat ha estat reconeguda com una diana imprescindible per millorar l'impacte dels vector virals en la salut.

L'objectiu d'aquest estudi va ser la identificació d'una combinació adequada d'excipients que permetés conservar l'Adenovirus tipus 5 a temperatures superiors mantenint la infectivitat a nivells acceptables. Alhora s'havia de dissenyar un cicle de liofilització que permetés una estabilitat millorada que limités les pèrdues de funcionalitat amb un comportament més controlable i reproduïble.

Aquest objectiu requeria d'una aproximació global que comencés analitzant els factors que intervenen en l'estabilitat viral abans i després de la liofilització, i els mecanismes responsables de la inactivació durant l'emmagatzematge. Entre els factors que afecten l'estabilitat destaquen la concentració vírica, el pH, l'agregació i la humitat. És crucial controlar els darrers paràmetres durant el procés mitjançant la tècnica de *Dynamic Light Scattering* (DLS) i *coulometric Karl Fischer titration*, així com verificar el títol físic i funcional a les diferents etapes del procés per garantir un bon disseny.

Es va desenvolupar un set de formulacions per avaluar la seva efectivitat protectora en solució a 5°C , en liofilització i durant l'emmagatzematge. S'ha identificat una formulació estable un mínim de 8 h a temperatura ambient adient per l'escalat industrial. Els cicle de liofilització dissenyat i la formulació seleccionada eviten les pèrdues d'activitat durant la liofilització a la mida de lot establerta. La funcionalitat es manté fins al punt d'anàlisi de l'estudi d'estabilitat de 3 mesos a 5°C i -20°C . La formulació candidata està essent sotmesa a un estudi d'estabilitat de 2 anys a -20°C , 5°C i 25°C .

ABSTRACT

Adenoviral vectors are far from being commonly established in clinic use because of the complexity to preserve their activity at optimal conditions of transport and administration. Currently, the stabilization of adenovirus for long-term storage requires the presence of glycerol at -80°C. This ultra-low temperature creates significant inconvenient for storage, transport and practical clinic use. In the other hand, the presence of glycerol requires an extensive dilution before administration to reduce toxic effects. So, enhancing the thermostability has long been recognized as the target for improving the impact of viral vectors on world health.

The goal of this study was the identification of a suitable combination of excipients which allows the storage of Adenovirus type 5 vector at higher temperatures and the maintenance of infectivity at an acceptable level. At the same time, it was necessary a design of a lyophilization process that enhanced stability by limiting the loss of infectivity with a more controllable and reproducible behavior.

This goal requires a global approach that starts by analyzing the factors that influence stability of viral preparations prior to and during freeze-drying, and the major mechanisms responsible for inactivation during storage. Among the factors that affect stability highlight virus concentration, pH, aggregation and residual water. It is crucial to control the previous factors during the process by Dynamic Light Scattering (DLS) and coulometric Karl Fischer titration, as well as verify the physical and functional titer at different points of the process to assure well-design.

A battery of formulations has been developed to test its effectiveness in terms of liquid stability at 4°C, freeze-dry impact and stability of lyophilized powder during storage. A formulation stable until 8 hours in liquid at room temperature has been identified what it is suitable for industrial scale. The designed lyophilization process with the selected formulation avoid the loss of activity during lyophilization at the established lot size. The titer is maintained at the analytical point of stability study of 3 months at 5°C and -20°C. This formulation is being submitted to a 2-years stability program at -20°C, 5°C and 25°C.

1. INTRODUCCIÓ

1.1. TERÀPIA GÈNICA

En les últimes dècades, les Ciències de la Salut s'han focalitzat en el desenvolupament de tècniques per a lliurar gens en cèl·lules o teixits amb l'objectiu terapèutic de prevenir o tractar una malaltia. Aquesta tècnica és coneguda com Teràpia gènica i s'ha utilitzat en almenys 1500 assajos clínics des del primer assaig en humans al 1990. Així doncs, és un procés en expansió que ha generat moltes expectatives com a futura eina alternativa o complementària per al tractament de malalties on el tractament farmacològic convencional no ha resultat satisfactori (Bosch *et al.*, 2010).

El progrés en aquest camp fa pales la possibilitat de millorar o tractar una malaltia mitjançant el lliurament de gens, però hi ha diverses dificultats associades a qualsevol aproximació de teràpia gènica, el que fa necessari que s'hagin d'introduir millores a nivell d'eficàcia, estabilitat i seguretat.

En primer lloc, s'ha de garantir poder incorporar una seqüència genòmica llarga pel gen terapèutic i les seqüències reguladores. També és comuna la necessitat d'una alta eficiència de transducció degut als petits volums que poden ser administrats. Així mateix, és habitual que es requereixi una expressió del transgen a llarg termini i per tant, una expressió estable. A més, es desitja obtenir els nivells adequats de producte, controlar la seva expressió i alhora aconseguir especificitat en la transferència gènica sense una toxicitat i resposta immune, excepte en el tumors on aquesta resposta és part de l'acció terapèutica. No obstant, la inactivació del promotor, efectes citotòxics, la pèrdua de seqüències del vector o la resposta immune enfront a proteïnes exògenes dificulten assolir aquest objectiu. Així doncs, hi ha múltiples requisits per a un vector terapèutic [Costantini *et al.*, 2000].

Una de les decisions més importants en una aproximació de Teràpia gènica és l'elecció del vector, el vehicle utilitzat per lliurar el gen terapèutic, ja que la resta del procés es basarà en la modificació i optimització de l'estratègia escollida. Encara que no sigui el vector idoni, aquest ha de complir els requeriments esmentats tant com sigui possible. La dificultat de trobar l'estratègia adequada per teràpia gènica s'ha vist reflectida en la divisió de la comunitat científica enfront a l'ús de vectors virals o no-virals. L'opinió a favor dels vector no-virals sustenta l'alta adaptabilitat de les molècules per la seva naturalesa química, l'altra capacitat d'incorporar un llarg transgen, el fet que no són immunogènics o tòxics, permetent l'administració de dosis altes i fins i tot, la re-administració. Els que donen suport als vector

virals opinen que els virus són una forma natural de lliurar gens. Aquests han evolucionat amb els anys per ser capaços de lliurar àcids nucleics d'una manera que sigui tolerada per l'hoste. Així doncs, presenten una plataforma per la Teràpia gènica on s'aprofita les primeres etapes del cicle viral i s'eliminen les últimes [Costantini *et al.*, 2000; Neve & Carlezon, 2002; Bowers *et al.*, 2011]. En qualsevol cas, la majoria de resultats prometedors en clínica i preclínica s'han obtingut amb vectors virals. Avui en dia, aquests vectors continuen essent la primera opció com a vehicle terapèutic.

1.2. ADENOVIRUS

Hi ha diferents virus estudiats per a l'aplicació en teràpia gènica com ara virus simple de l'Herpes (HSV), Adenovirus (ADV), Adeno-associated virus (AAV) i Lentivirus. No obstant, els adenovirus compleixen la majoria de requisits exigits i han estat la primera opció en l'última dècada. Aquesta tendència predominant és atribuïda a algunes propietats dels adenovirus com ara el seu creixement, la seva manipulació àmpliament coneguda i el fet que el seu plasmidi és episomal i té una baixa genotoxicitat en les cèl·lules de l'hoste. A més, aquests permeten alts nivells de producció, tenen una alta infectivitat i no s'han identificat efectes secundaris amb el virus *wild-type* (salvatge), el que assegura la seguretat i el potencial terapèutic. Entre els adenovirus, l'adenovirus tipus 5 (Ad5) és el que ha estat recentment utilitzat en la majoria de propostes de teràpia gènica [Bowers *et al.*, 2011].

Els ADV són una família de virus de doble cadena de DNA d'entre 34-48 kb, sense envolta i amb una geometria icosaèdrica d'uns 90 nm de diàmetre aproximadament [Vellinga *et al.*, 2005]. El primer adenovirus va ser aïllat en cèl·lules humanes i des d'aleshores s'han descobert 51 serotips humans mitjançant mètodes serològics tradicionals classificats per l'hemaglutinació i la reacció de neutralització del sèrum. Fins a 68 serotips s'han identificat mitjançant seqüenciació genòmica i anàlisi bioinformàtica, dels quals alguns són virus emergents i recombinants [Ghebremedhin, 2014]. El gènere *Mastadenovirus*, grup d'adenovirus d'animals vertebrats, no tan sols s'ha identificat en humans sino també en altres mamífers com ara ovelles, gossos entre altres. Els adenovirus humans (HAdV) són classificats en 7 espècies de l'A a la G basant-se en diferents característiques com l'homologia de la seqüència d'ADN (superior al 48% intraespècie), el tropisme, el potencial de transformació i la capacitat d'aglutinació dels glòbuls vermells. Aquests són una de les

causes principals d'infeccions lleus respiratòries, oculars, estomacals i urinàries [Rux & Burnett, 1999]. La majoria d'adults hem estat infectats per Ad5 i Adenovirus tipus 2 (Ad2), que són de l'espècie C amb una homologia de DNA del 99%, relacionats freqüentment amb infeccions respiratòries lleus. Tot i que alguns serotips incrementen la morbidesa en individus amb el sistema immune compromès.

1.2.1. Ad5: Estructura i funcions

La partícula d'adenovirus o virió és una cobertura proteica, anomenada càpsida, que envolta la doble cadena de DNA. Aquesta té una forma icosaèdrica amb 252 projeccions de la superfície, també coneguts com capsòmers. La càpsida està composta per 13 proteïnes que històricament s'han numerat per la mobilitat electroforètica creixent de les proteïnes de partícules purificades de l'Ad2 [Vellinga *et al.*, 2005; Russell, 2009]. Són 3 proteïnes estructurals les que constitueixen bàsicament la càpsida. La proteïna principal és la proteïna homotrimèrica *hexon*, o proteïna II, que constitueix gran part de la massa de la càpsida d'aproximadament 150×10^6 Da. D'altra banda, tenim la proteïna pentamèrica *penton base*, o proteïna III, a cada un dels 12 vèrtexs de la qual projecta una proteïna homotrimèrica anomenada *fiber*, o proteïna IV. Totes dues formen el complex *penton*, involucrat en el procés d'infecció en l'etapa d'acoblament virus-cèl·lula i el procés d'internalització cel·lular. A part d'aquestes tres proteïnes estructurals, conté 4 proteïnes estructurals minoritàries: IIIa, VI, VIII i IX, localitzades a la part interna i externa de la superfície que cimenten la interacció *hexon-hexon* i *hexon-penton* [Stewart *et al.*, 1991; Stewart *et al.*, 1993]. A més, hi ha sis proteïnes situades al nucli víric, cinc associades amb el DNA: V, VII, Mu, IVa2 i la proteïna terminal (TP), i la proteasa vírica crucial per a l'assemblatge del virió. El progrés en cristal·lografia de raigs X i microscòpia crio-electrònica ha permès reconstruir una imatge de la distribució dels diferents components (Figura 1).

1.2.1.1. *Hexon*

L'*hexon*, la proteïna majoritària dels HAdVs, va ser la primera proteïna animal vírica cristal·litzada. Això va permetre la determinació de la seva estructura per raigs X i va suposar l'inici d'una anàlisi estructural de la càpsida completa que mitjançant els avenços en microscòpia crio-electrònica ha estat possible la identificació i localització de la resta de proteïnes [Nemerow *et al.*, 2012].

El capsòmer d'*hexon* és un trímer pseudo-hexagonal per les tres repeticions dels fulls beta. Hi ha un total de 240 còpies on cada una de les 20 cares de la càpsida està formada per 12 còpies. Aquestes es classifiquen en H1, H2, H3 i H4 segons el seu escenari i les proteïnes adjacents. Les designades H1, també anomenades peripentonals, són aquelles annexes a la proteïna *penton* als 12 vèrtexs de la càpsida. La resta d'*hexons* estan agrupades en grups de nou, conegut com *group of nine* (GON). Així doncs, *hexon* és la que dona el major suport estructural a la càpsida, amb les interaccions entre ella mateixa i amb altres components estructurals.

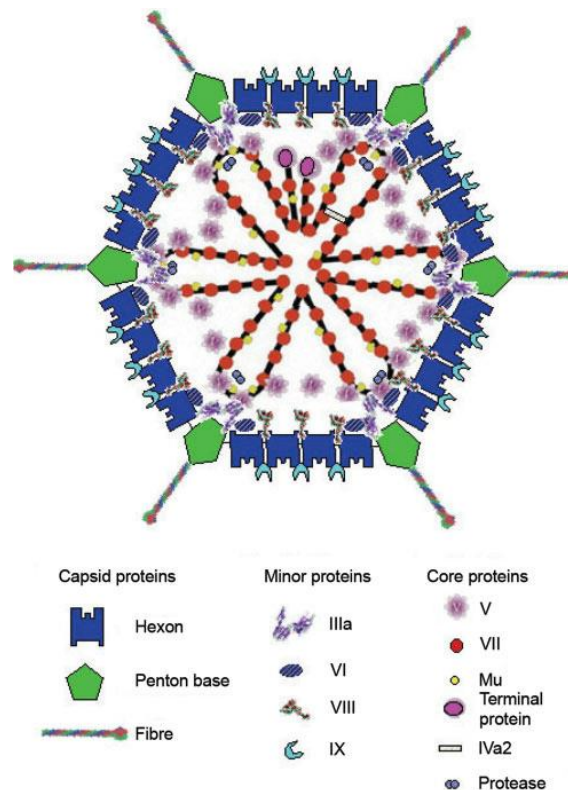


Figura 1. Proteïnes de l'adenovirus humà tipus C. Hi ha tres gran grups: les proteïnes majoritàries de la càpsida (*hexon*, *penton base* i *fiber*), les proteïnes estructurals minoritàries (IIIa, VI, VIII i IX) i les proteïnes del nucli (V, VII, Mu, la proteïna terminal, IVa2, i la proteasa) (Russell, 2009).

La mida de la subunitat d'*hexon* varia segons el serotip. Mitjançant l'anàlisi comparativa de les seqüències s'han identificat regions conservades importants per a l'estructura del viriò (entre el 70-80%) i regions no-conservades exposades a la superfície anomenades regions hipervariables (HVRs). S'han identificat almenys 9 HVRs relacionades amb l'especificitat antigènica de cada serotip i per tant, les dianes dels anticossos neutralitzants.

L'extensa presència d'*hexon* fa que es desenvolupi una resposta immune humoral potent que suprimeix l'expansió vírica i la reinfecció en una segona administració, i és un dels motius pels quals no s'ha arribat a explotar tot el potencial dels adenovirus en vacunes i teràpia gènica. Tot i que la *fiber* també conté determinants específics de serotip, els anticossos anti-*fiber* només neutralitzen l'infecció vírica *in vitro*, no *in vivo* com en el cas d'anticossos anti-*hexon* [Rux & Burnett, 1999]. Això ha desencadenat tot un seguit de nombrosos intents per crear nous vector adenovirals amb la proteïna *hexon* modificada o quimèrica, reemplaçant part de la seqüència per la d'un altre serotip evitant la resposta immune contra l'*hexon* nativa.

1.2.1.2. Complex *penton*: *penton base* i *fiber*

El complex *penton* és un complex no-covalent format per la proteïna homopentamèrica *penton base* i la proteïna homotrimèrica *fiber*. Aquestes constitueixen els components necessaris per la interacció i la internalització cel·lular del virus. És un complex format per cinc subunitats de la proteïna III i tres subunitats de la proteïna IV. Aquest està situat als 12 vèrtexs de la càpsida icosaèdrica on la pentamerització confereix estabilitat amagant les regions hidrofòbiques i creant uns porus on s'uneix de forma no covalent l'extrem N-terminal de la proteïna *fiber* que projecta de la superfície [Russell, 2009]. El complex és molt estable i pot ser dissociat per tractament amb agents caotròpics o bé amb elevades temperatures [Boudin & Boulanger, 1982]. Tot i així, les *hexons* tipus H1 associades a aquest complex *penton* i les proteïnes VI i IIIa sembla ser que són l'estructura vírica menys estable en la primera etapa de la infecció, i probablement més susceptibles als canvis de pH que tenen lloc a l'endosoma.

A la proteïna *fiber* es poden distingir tres regions: la cua (regió N-terminal), la regió o eix central i un domini globular (regió C-terminal), conegut com a Knob. L'extrem N-terminal conté una regió conservada entre serotips, FNPVYPV, que interacciona amb el canal hidrofòbic del pentàmer de *penton base* [Russell, 2009]. S'ha proposat una interacció on la cua de cada monòmer de *fiber* actua com un cable estabilitzador connectant amb tres de les 5 juntes dels monòmers de *penton base*. Aquesta connexió estableix l'asimetria entre la proteïna *fiber* trimèrica i la *penton base* pentamèrica [Liu *et al.*, 2011]. L'estabilitat d'aquesta interacció està afavorida per ponts d'hidrogen i enllaços iònics. D'altra banda, la regió central està formada per un nombre variable de pseudo-repeticions de grups de 15-20 aa que la fan rígida i estable, però alhora suficientment flexible facilitant la unió a dues regions diferents (CAR i les α -integrines) i contribuint a la capacitat d'unir-se i infectar a les

cèl·lules [Changchun *et al.*, 2012]. I per últim, el domini globular knob, del qual emanen diversos pèptids variables que proveeixen els llocs d'unió per als diferents receptors i alhora determinen les propietats d'hemaglutinació. Aquesta interacció *fiber*-receptor cel·lular és la primera etapa d'unió a la cèl·lula, establerta mitjançant CAR, receptor principal dels subgrups A i de C a F. Hi ha receptors alternatius com CD46 per alguns serotips del subgrup B i D.

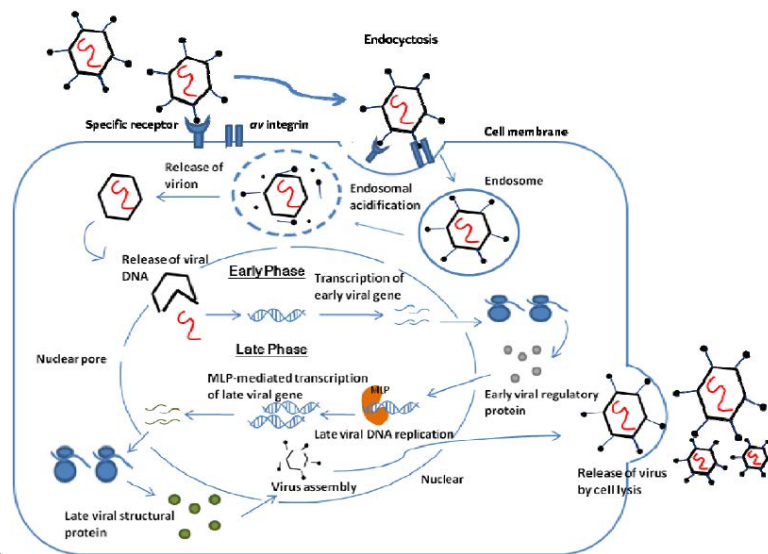


Figura 2. Cicle víric dels adenovirus. El virus interacciona amb el receptor CAR i el coreceptor α -integrina. Un cop es dona l'unió, algunes fibres són alliberades i la *penton base* experimenta un canvi conformacional que afebleix l'estabilitat de la càpsida. El virus és internalitzat i continua el desassemblatge a l'endosoma. El virió parcialment desmantellat escapa de l'endosoma i és transportat mitjançant els microtúbuls al nucli on entra pel porus nuclear el DNA. Aquest és replicat i alhora es sintetitzen les proteïnes necessàries per a l'assemblatge de nous virions que seran alliberats per la lisi cel·lular (Waye & Sing, 2010).

L'estructura de la *fiber* està conservada entre els diferents serotips i aquesta contribueix en el tropisme de teixit i el patró associat de malalties [Russell, 2009]. L'Ad5, del tipus C, és el principal causant de malalties respiratòries lleus i també d'algunes gastrointestinals i urinàries, però l'epiteli respiratori és la diana principal d'infecció. El primer responsable d'aquest tropisme és CAR, ja que aquest s'expressa en les unions intracel·lulars com les unions estretes de les cèl·lules epitelials. El seu mRNA sembla estar present en diversos òrgans com pulmons, cor, cervell, pàncrees entre d'altres. Així doncs, s'haurien de manifestar malalties en altres òrgans segons l'expressió de CAR. Tanmateix, l'expressió de

CAR no és equivalent al tropisme *in vivo* de l'Ad5 per la presència de barreres anatòmiques i immunològiques [Fechner *et al.*, 1999]. D'altra banda, hi ha un altre factor limitant imposat pels requisits geomètrics derivats de la necessitat d'interacció doble amb els receptors CAR i les integrines. Hi ha altres espècies com la A que també causen malalties respiratòries, tanmateix, la *fiber* de l'espècie tipus C té una afinitat d'unió al receptor CAR soluble molt més gran. Així doncs, si es volgués modificar el tropisme de l'Ad5 i es volgués infectar un tipus cel·lular específic, s'hauria de bloquejar o reduir la interacció amb CAR. En relació al canvi de tropisme, hi ha hagut nombrosos intents canviant de forma completa o parcial la proteïna *fiber* per la d'un altre serotip que tingui una especificitat per un receptor diferent, però això no és suficient si no es combina amb algun canvi al domini knob que redirigeixi aquest tropisme natural cap a un altre receptor específic d'un tipus cel·lular [Jakubczak *et al.*, 2001].

La proteïna *penton base* forma una estructura en forma de cubeta que permet encaixar a la proteïna *fiber*, però també té un paper important en l'estabilització de la càpsida interaccionant amb les *hexons* adjacents. No obstant, està ben establert que la *penton base* és la regió més feble de la càpsida, ja que és sensible a la temperatura, a la tripsina, al pH i als canvis de força iònica [Rexroad *et al.*, 2006]. La seva seqüència està altament conservada entre HAdV i altres adenovirus animals, tret d'una regió hipervariable de longitud variable exposada a la superfície requerida per a la segona etapa d'unió amb la cèl·lula interaccionant amb les α -integrines [Zubieta *et al.*, 2005]. En aquesta interacció el motiu Arg-Gly-Asp (RGD) de la regió hipervariable és essencial per la internalització del virus mitjançant endocitosi [Wickham *et al.*, 1993]. Aquesta interacció activa una cascada de senyalització que promou una ràpida internalització mitjançant vesícules de clatrina i endosomes [Li *et al.*, 1998] (Figura 2). S'han detectat anticossos neutralitzants de la *penton base* on el epítops responsables s'han situat en les regions proximals a la seqüència RGD, fet que corrobora la seva importància en aquesta etapa de reconeixement per a la infecció. El motiu RGD sembla que també facilita l'alliberament dels virions de l'endosoma [Shayakhmetov *et al.*, 2005a]. A més, s'ha reportat que la proteïna *fiber* es desassembla de la proteïna *penton base* després de la reacció amb les integrines [Nakano *et al.*, 2000], de manera que és la proteïna *penton base* la que facilita principalment l'entrada cel·lular.

El complex *penton* és el que està involucrat en el procés d'infecció. En concret, el procés d'unió amb la cèl·lula està mediat per la interacció de la proteïna *fiber* amb el receptor de

coxsackievirus i d'adenovirus (CAR), i l'entrada a la cèl·lula per la unió de la *penton base* amb les α -integrines (Figura 2). Tanmateix, s'ha descobert que la proteïna *hexon* també està involucrada en aquest procés al fetge quan es du a terme una administració via parenteral. Degut a que la modificació dels dominis involucrats en la unió a receptors d'aquest complex *penton* no redueixen la transducció a hepatòcits pròpia de l'Ad5, l'administració via parenteral no utilitza CAR per a la transducció del fetge i requereix de vies alternatives. Això ha permès la identificació de proteïnes plasmàtiques com ara el factor X que actua com a pont unint-se a les HVRs d'*hexon* de la partícula vírica permetent la interacció amb les cèl·lules del fetge [Imperiale, 2008; Waddington *et al.*, 2008]. Per tant, si es desitja canviar el tropisme de l'Ad5 o es vol reduir l'hepatotoxicitat, no només caldria modificar la proteïna *fiber*, sinó combinar-ho amb canvis a *hexon*.

1.2.1.3. Proteïnes estructurals minoritàries: IIIa, VI, VIII i IX

Tant la proteïna IIIa, VI com VIII són sintetitzades com a un llarg precursor que és processat per a ser funcional i obtenir la proteïna madura. La proteïna IIIa està situada als 12 vèrtexs de la càpsida amb una còpia a sota la proteïna *penton base* interaccionant amb ella i alhora amb el monòmer adjacent de IIIa i dues *hexons* [Liu *et al.*, 2010]. Així doncs, actua de cement estabilitzant els capsòmers de 6 unitats formats per la *penton base* i les 5 proteïnes *hexons* adjacents. Aquesta capsòmers són anomenats GOS (*group of six*). S'ha demostrat que la falta de la proteïna IIIa causa un mal assemblatge del virió i l'acumulació de partícules víriques buides. També ha estat relacionada amb l'especificitat de serotip en l'empaquetament del DNA durant l'assemblatge de la càpsida.

En el cas de la proteïna VI no està clara la seva estructura i la seva localització. No obstant, sembla que està en contacte amb la cavitat interna de la proteïna *hexon*, i alhora associat amb IIIa i a *penton base*. La proteïna VI és alliberada del virió en l'entorn àcid de l'endosoma i permet la disrupció de la membrana endosomal facilitant el transport del virus cap al nucli cel·lular. D'altra banda, juga un paper essencial en la maduració de la càpsida, ja que el processament del precursor de VI i l'alliberament de l'extrem C-terminal fan que la proteasa s'activi [Honkavuori *et al.*, 2004; Webster *et al.*, 1993; Webster & Kemp, 1993]. Paral·lelament, abans del processament, el precursor facilita la importació d'unitats d'*hexon* sintetitzades *de novo* cap al nucli i després del processament, participa en l'assemblatge del virió [Wodrich *et al.*, 2003].

En tercer lloc, la proteïna VIII, la qual no està gaire caracteritzada, s'ha localitzat a la part interna de la càpsida interaccionant amb la proteïna *hexon*. La seva localització suggereix la seva intervenció com estabilitzadora dels capsòmers de 9 *hexons* anomenats GONS connectant cada GOS amb els 5 GONS circumdants. La mutació d'aquesta fa que sigui més termolàbil el virió [Liu *et al.*, 1985].

Per últim, la proteïna IX que és la més petita de les proteïnes estructurals i la única que està present en els *Mastadenovirus* i absent a la resta de gèneres d'adenovirus. Aquesta proteïna es localitza a les cavitats entre *hexons* a la superfície de la càpsida actuant d'estabilitzadora dels GONS, i connectant un GON amb un altre, aportant termoestabilitat a la càpsida [Liu *et al.*, 2010]. S'ha demostrat que l'absència de la proteïna IX no permet la correcta formació dels complexos GONS i els virions són més sensibles a la temperatura [Boulanger *et al.*, 1979, Colby & Shenk, 1981]. Addicionalment, s'ha descobert la possibilitat d'incorporar lligands o fusionar proteïnes a la proteïna IX sense comprometre l'estabilitat de la càpsida permetent afegir un marcador fluorescent per fer un seguiment del virus a la cèl.lula infectada o bé, afegir un lligand per facilitar la unió a un receptor determinat [Le *et al.*, 2004; Meulenbroek *et al.*, 2004; Vellinga *et al.*, 2005].

1.2.1.4. Proteïnes del nucli víric: V, VII, Mu, IVa2, la proteïna terminal (TP) i la proteasa vírica

Entre aquestes proteïnes es troba la proteïna V i VII que interaccionen amb el DNA, i així com V sembla que és dispensable, la proteïna VII té un paper crucial en la importació del DNA víric al nucli cel·lular mitjançant la xarxa de microtúbuls i l'associació amb el centre organitzador de microtúbuls (MTOC) [Lee *et al.*, 2003; Wodrich *et al.*, 2006]. D'altra banda, al nucli es troba la proteïna IVa2 que participa en l'empaquetament del genoma víric on és possible que proveeixi l'activitat ATPasa. Sembla que també té un paper en l'encapsidació i en la regulació transcripcional tardana [Ostapchuck *et al.*, 2011; Ostapchuk *et al.*, 2005; Tyler *et al.*, 2007; Zhang & Arcos, 2005]. En el cas de Mu, sembla que el seu precursor està implicat en la regulació de proteïnes primerenques [Lee *et al.*, 2004]. La proteïna terminal (TP) covalentment unida a l'ADN víric facilita la circulació del genoma. A més, aquesta proteïna és sintetitzada com un precursor on el seu processament per la proteasa vírica la fa essencial per a la replicació [Webster *et al.*, 1997b].

1.3. LIOFILITZACIÓ

El procés de liofilització és un procés de dessecació en el qual el solvent és congelat i posteriorment eliminat per sublimació sense produir cap canvi en l'estructura bàsica del producte ni en la seva composició. Aquest procés es va desenvolupar comercialment durant la segona guerra Mundial per a preservar el plasma sanguini i la penicil·lina. A més de mantenir les característiques desitjades en el producte final, permet treballar a temperatures baixes augmentant l'estabilitat del producte i disminuint la pèrdua de substàncies volàtils, assolir un producte amb baixa humitat final amb una alta porositat i solubilitat ràpida, i inclús reduir l'oxidació gràcies a l'ús del buit. No obstant, cal tenir en compte que els equips són cars, té un alt consum energètic i té una duració elevada. La liofilització és àmpliament aplicada en el camp alimentari i farmacèutic, des de antibiòtics, vacunes, llet materna fins a microorganismes. Essent aquest un procés car i d'alt consum energètic, s'utilitza en productes amb característiques determinades com ara productes inestables, substàncies termolàbils i productes d'elevat cost com ara proteïnes o complexes proteics com els virus.

El procés es pot descriure en tres etapes: congelació, assecat primari i assecat secundari. La primera etapa de congelació implica la congelació del producte i la creació d'una matriu sòlida adequada per l'assecat. Aquesta etapa impacta en les característiques de les dues etapes posteriors d'assecat. A l'etapa d'assecat primari s'elimina l'aigua congelada per sublimació reduint la pressió de la cambra mentre que es manté la temperatura del producte baixa. I per últim, l'assecat secundari en el que l'aigua unida és eliminada per evaporació fins que s'assoleix la humitat residual final desitjada.

No hi ha un cicle adequat per a totes les formulacions proteiques. Cada cas té les seves particularitats, ja que cada proteïna té les seves característiques estructurals per a dur a terme una funció biològica determinada i cada formulació és qualitativa i quantitativament diferent. No obstant, generalment totes les formulacions compleixen els criteris següents: (1) una estabilitat en solució mínima per a permetre la fabricació del lot, la filtració i alhora el dosificat, (2) una estabilitat durant el procés de liofilització, (3) una estabilitat suficient del liofilitzats en les condicions d'emmagatzematge seleccionades i alhora (4) que la formulació no presenti senyals de col·lapse ni de fusió, fenomen conegut com *meltdown*, durant la liofilització [Chang & Patro, 2004].

El col·lapse es defineix com el procés pel qual el producte s'estova tant que no és capaç de suportar la seva pròpia estructura perdent l'estructura elegant, porosa i esponjosa resultant del procés de liofilització. En relació a aquest fenomen, hi ha dos paràmetres importants, la temperatura de transició vítreia (T_g') de la fase amorfa i la temperatura de col·lapse (T_c). La T_g' és la temperatura a partir de la qual es passa estat vítri a un estat gomós en el que s'incrementa la mobilitat de l'aigua. Donat que la T_c acostuma a ser uns graus superiors a la T_g' , l'augment lleuger de temperatura pot produir un col·lapse. Aquest procés pot ser degut a diversos motius com ara el fet que la fase amorfa adquireixi major mobilitat degut a l'exposició a temperatures superiors a la T_g' , o bé per la cristal·lització durant l'emmagatzematge de compostos cristal·lins on l'aigua alliberada augmenta la humitat residual de la pastilla. En ambdós casos, pot haver una pèrdua parcial o total de l'estructura de la pastilla a nivell microscòpic o macroscòpic. Així doncs, conduirà a una aparença inadequada a més d'un augment de la humitat residual i una reconstitució lenta per la pèrdua de porositat i reducció de l'àrea [Pikal, 1991; Chang & Patro, 2004; Cirone *et al.*, 2003]. S'ha especulat que aquest fenomen pertorba l'estructura de la proteïna, tanmateix no ha estat demostrat fins al moment. Tot i que de forma indirecta, les conseqüències del col·lapse poden ser responsables de mecanismes desestabilitzadors de la proteïna. Com que l'aigua congelada és sublimada durant l'assecat primari, per a que no hi hagi col·lapse, cal mantenir la integritat estructural de la fase amorfa. Per evitar-ho, és crític que durant l'assecat primari la temperatura del producte estigui per sota de la T_g' . Cal destacar que idealment es desitja una formulació amb una T_g' elevada per a facilitar, agilitzar i abaratir el procés. En el cas que la T_g' sigui molt baixa és possible que els liofilitzadors no tinguin la capacitat d'assolir temperatures tan baixes i hi hagi restriccions pel disseny de l'equip. Així doncs, caldrà buscar una altra estratègia per tal d'assolir una temperatura en el producte per sota de la T_g' . Això és possible aplicant una pressió a la cambra durant l'assecat primari tal que l'aigua congelada en equilibri amb aquesta pressió tingui una temperatura inferior a la T_g' . Per exemple, si es vol assolir una temperatura de -50°C , caldrà aplicar una pressió de cambra inferior a la pressió de vapor de l'aigua congelada a -50°C [Chang & Patro, 2004]. No obstant, normalment es redueix un quart o un terç aquesta pressió per tal d'assegurar la sublimació de cada una de les capes del liofilitzat, ja que les capes més internes tindran una resistència superior que les capes superficials. Alternativament, si les estratègies anteriors no són efectives, es pot assolir una estructura adequada de la pastilla liofilitzada incloent excipients que cristal·litzin i que confereixin a una estructura macroscòpica rígida. En aquest

cas, un col·lapse de la fracció amorfa només es manifestaria a nivell microscòpic en les regions entre els cristalls.

D'altra banda, tenim la fusió o *meltdown* que seria la fusió eutèctica de la fracció cristal·lina. Per a prevenir aquest fenomen, cal mantenir la temperatura del producte per sota de la temperatura eutèctica (T_e) dels components cristal·lins de la formulació durant l'assecat primari.

Tots dos fenòmens es basen en el manteniment de la temperatura del producte en l'assecat primari per sota de T_g' o T_e , respectivament. De manera que són essencials aquests dos paràmetres per al disseny del procés de liofilització. Hi ha diferents mètodes analítics per a caracteritzar els canvis físics que tenen lloc en les formulacions congelades on els més comuns són la calorimetria diferencial d'escombratge (DSC) i la microscòpia de liofilització (FDM). La FDA declara que el fabricant d'un producte ha de conèixer els paràmetres tèrmics d'aquest (FDA, 1993).

1.3.1. Congelació

Habitualment abans de la congelació s'equilibren tots els vials a una temperatura de 5°C baixant la temperatura de la safata a temperatures d'entre -5°C i -10°C durant uns 15-30 minuts per tal d'aconseguir una congelació uniforme abans de disminuir linealment la temperatura de la safata [Hansen *et al.*, 2015]. A continuació, s'inicia l'etapa de congelació per una refredament ràpid de les safates fins a la temperatura desitjada i es manté aquesta temperatura constant el temps desitjat.

La congelació ha de dur-se a terme per sota de la T_e , la temperatura per sota de la qual congelen tots els components, en el cas de productes cristal·lins. En el cas de productes amorfs, la T_g' és el paràmetre rellevant. Habitualment s'utilitzen temperatures d'entre -40°C y -50°C on el producte estarà totalment congelat i s'evitaran efectes perjudicials durant la liofilització. La congelació condiciona l'aspecte del producte, la velocitat de sublimació durant l'assecat primari i la facilitat de desabsorció durant l'assecat secundari. Així doncs, per aquesta etapa no tan sols és important conèixer la temperatura mínima de congelació, sinó també la velocitat de congelació, és a dir la durada, i per tant, cal estudiar els paràmetres necessaris per a cada producte. Una congelació ràpida és favorable en quant a la preservació de l'estructura i funcionalitat. No obstant, degut a que la transmissió del fred per mitjà d'una massa congelada és deficient, es produeix una congelació ràpida a la base de la massa, la

zona en contacte amb les safates, i la part superior congela més lentament causant una diferència escalonada en l'estructura del producte. Per a cada rampa de congelació caldrà definir el valor de temperatura final, la durada i el control de marges de temperatura, el que permet controlar el bon funcionament de l'equip. De manera que l'etapa comença per la temperatura de la màquina a l'inici d'aquesta etapa i es crea una rampa per arribar a la temperatura final desitjada en el temps establert.

Cal tenir en compte que temperatures inferiors a -45°C són difícils d'aconseguir per alguns equips de gran escala. Alhora alguns liofilitzadors de petita escala són capaços d'assolir velocitats més altes que els de gran escala. De manera que s'ha d'estudiar el rang òptim de velocitat per a una formulació basant-se en les característiques de degradació de la proteïna així com la mida dels cristalls i establir quin marge d'aquest rang pot ser assolit de forma còmoda per un procés a escala industrial.

A l'etapa de congelació es pot dur a terme una subetapa per a garantir la cristallització total o gairebé total dels components cristal·lins com són els agents de càrrega, o bé per augmentar la mida dels cristalls. Aquesta subetapa coneguda com *annealing* és una etapa d'escalfament en la que es puja la temperatura normalment 10°C per sobre de la temperatura de desvitrificació, però no ha de superar la T_e per a evitar la fusió eutèctica del components cristal·lins. Aquesta subetapa addicional incrementa significativament la velocitat de l'assecat primari i millora la homogeneïtat i l'aparença de la pastilla del producte final [Yu *et al.*, 1999; Johnson *et al.*, 2002]. La completa cristallització durant la congelació afavoreix l'estabilitat en l'emmagatzematge, ja que si un component amorf o hidratat cristal·litza després de la liofilització, s'alliberarà aigua augmentant la humitat residual i creant potencialment un ambient desestabilitzador.

1.3.2. Assecat primari

La segona etapa de liofilització és l'assecat primari en la que té lloc la sublimació de l'aigua congelada, on es passa de l'estat sòlid a vapor reduint la pressió mitjançant una bomba de buit i aportant calor al producte mitjançant unes safates d'acer inoxidable que transfereixen la calor als vials que contenen el producte (Figura 3). Aquesta etapa és la més cara perquè és la que té major durada i implica major consum energètic. En aquesta etapa s'ha de controlar la velocitat d'assecat i la velocitat d'escalfament de les safates, ja que un escalfament molt ràpid faria que el producte es fongués i a baixa pressió bulliria. Així doncs,

mentre duri el procés de sublimació de l'aigua congelada, el producte romandrà fred, i per tant, la temperatura del producte ha d'estar per sota de la temperatura de les safates (Figura 4). Els dos paràmetres crucials establerts són la temperatura de les safates i la pressió de la cambra. Per a definir temperatura cal conèixer la T_e o T_g' , ja que en cap cas s'haurà d'assolir aquesta temperatura. Si el procés d'assecat es dona per sota de la T_g' , l'aigua serà ràpidament retirada sense trencar la microestructura formada en l'etapa de congelació. Així doncs, la T_g' estableix el límit superior de temperatura a la qual es pot realitzar l'assecat primari de la liofilització reduint d'aquesta manera la pèrdua d'integritat física i funcional del producte durant el procés de liofilització. Aquesta finalitzarà un cop la temperatura del producte assoleixi la temperatura de les safates, on la durada de l'etapa dependrà de l'espessor del producte a liofilitzar, la proporció d'aigua inicial en relació a la matèria seca, la T_e i la humitat final desitjada. Normalment no es controla la durada de l'assecat primari mitjançant la temperatura del producte sinó mitjançant dues sondes de pressió, ja que la sonda de temperatura del producte pot donar un valor poc exacte de la massa total de producte. En el moment en que ambdues pressions s'igualen, l'assecat secundari podria finalitzar. No obstant, és una pràctica habitual, el fet d'allargar el primari per garantir la completa sublimació. En cas que es vulgui optimitzar el cicle, s'escurcen les hores d'assecat el màxim possible [Wang, 2000; Chang & Patro, 2004].

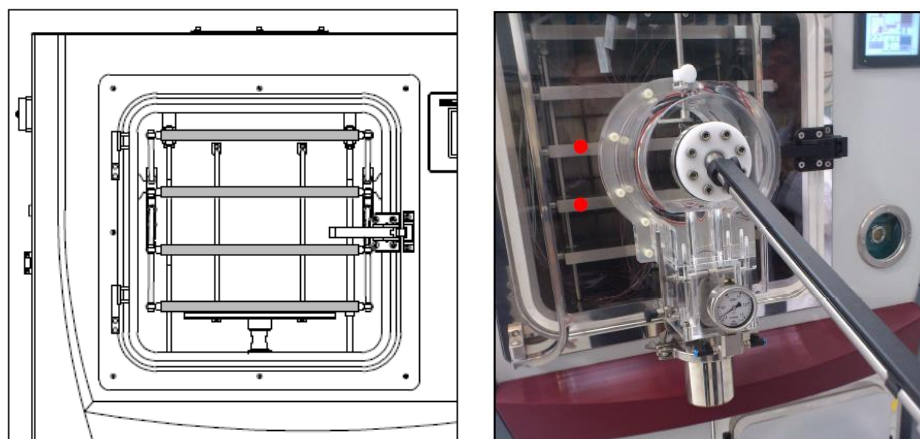


Figura 3. Cambra del liofilitzador on es poden veure les safates on es col·loquen els vials de producte (esquerra). Braç manipulador que permet extreure vials durant l'assecat secundari (dreta) (Manual de Lyobeta-20 de Telstar).

1.3.3. Assecat secundari

Per últim, té lloc l'assecat secundari on es dóna la desabsorció en la que s'elimina la humitat residual i l'aigua no congelable, lligada al producte. En aquesta etapa es defineixen rampes de temperatura superiors a l'assecat primari i el buit serà el màxim assolit per l'equip. La temperatura i durada d'aquesta etapa determinaran el percentatge final d'humitat del producte fins a un 1%. En el cas de components amorfs, el percentatge d'aigua no congelable és superior, el que fa que la durada d'aquesta etapa sigui més llarga. Tant la temperatura com la durada d'aquesta etapa s'ha de comprovar experimentalment per tal d'esbrinar quin són els marges adequats per al producte en el que s'està treballant. Un cop es retira el producte de les safates s'ha de comprovar l'aspecte i determinar el valor d'humitat residual i en cas que procedeixi, de funcionalitat. Es pot retirar el producte a final de cicle o bé fer diverses extraccions durant l'assecat secundari mitjançant un manipulador de mostres. Aquest manipulador de mostres és un braç que permet retirar els vials de la cambra podent determinar diferències d'humitat i de pèrdua de funcionalitat entre vials d'un mateix cicle a diferents temps i/o temperatures d'assecat secundari (Figura 3). D'aquesta manera serà possible determinar quines són les condicions idònies pel producte. S'ha de tenir en compte que la temperatura admesa per a un producte sec acostuma a ser superior a la d'un producte líquid fent que es redueixi el temps d'assecat final [Wang, 2000; Chang & Patro, 2004].

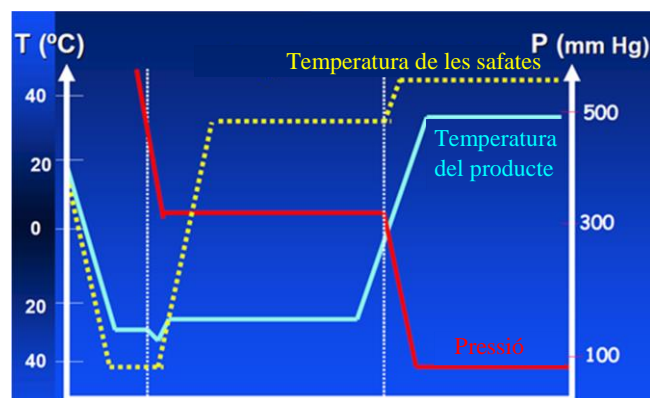


Figura 4. Diagrama de control del cicle de liofilització. En groc està representada la temperatura de les safates, en blau la temperatura del producte i en vermell, la davallada de pressió experimentada durant el cicle (Manual de Lyobeta-20 de Telstar).

1.4. ESTABILITAT DELS ADENOVIRUS

Tal i com prèviament s'ha descrit, l'objectiu de la teràpia gènica és aconseguir expressió del transgen amb la màxima seguretat, eficàcia i fiabilitat. Per aquesta raó, els vectors virals són els candidats més atractius des d'un punt de vista molecular i biològic. Per a mantenir la infectivitat i activitat biològica d'aquests agents és necessari assegurar la seva integritat estructural des de la seva preparació fins a l'administració en l'entron preclínic i clínic. Pot semblar obvi, però és crucial que la potència es mantingui fins a l'administració per a l'èxit a nivell preclínic i clínic. De fet, la ràpida pèrdua d'infectivitat durant l'emmagatzematge i el transport ha estat identificada com un dels factors crítics per a la translació de la teràpia gènica [Nyberg-Hoffman *et al.*, 1999; Croyle *et al.*, 2001]. La pèrdua d'estabilitat química i física és probablement una de les limitacions principals, ja que deriva en la degradació del vector viral, en una disminució de l'eficiència de transducció i la reducció de la seguretat i eficàcia del producte, donat que la ratio entre partícula vírica física i partícula vírica funcional augmenta [FDA, 2000]. De manera que la necessitat de millorar l'estabilitat fa temps que s'ha establert com a diana per a millorar l'impacte de la teràpia gènica a nivell mundial [Evans *et al.*, 2004; Cruz *et al.*, 2006].

Els adenovirus no són una excepció, i com s'ha comentat prèviament, l'estabilitat també és un important inconvenient, limitant les condicions d'emmagatzematge a la congelació, reduint el temps d'emmagatzematge a 5°C o bé, introduint la necessitat d'utilitzar la liofilització per a millorar a l'estabilitat.

Tradicionalment, els adenovirus han estat formulats en tampons fosfat i tampons Tris que contenen un 10-50% glicerol i altres excipients com sals, sucres inclús albúmina bovina. Actualment, hi ha un material de referència d'adenovirus (ARM) que consisteix en Ad5 formulat en Tris 25 mM NaCl 25 mM Glicerol 2,5% a pH 8.0 emmagatzemat a -70°C, formulació coneguda com a GTS. Aquest està disponible a l'ATCC amb el número de catàleg VR-1516. L'ARM va ser desenvolupat al 2002 sota les directrius de l'Equip de treball del material de referència d'adenovirus (Adenovirus Reference Material Working Group, ARMWG) i l'agència americana del medicament (FDA). Es va produir i caracteritzar l'Ad5 amb l'objectiu de tenir un material de referència per a tots els laboratoris. Els especialistes en l'àmbit van recomanar les diferents metodologies per aquest fi, però en cap cas es van definir una metodologia obligatòria per a la seva producció ni la seva caracterització [Nyberg-Hoffman *et al.*, 1997; Smith *et al.*, 1999; Hutchins *et al.*, 2000;

Hoffman, 2000; Vallekamp *et al.*, 2001; Hutchins, 2002]. És recomanable utilitzar l'ARM per a validar mètodes per a determinar la concentració de partícules víriques o el títol funcional [Simek *et al.*, 2002]. Els seu emmagatzematge a llarg termini requereix de la crioconservació, el que implica alicuotar els estocs virals i un emmagatzematge a -80°C . Assolir aquestes temperatures no tan sols és car, sinó que creen importants inconvenients a nivell d'emmagatzematge, transport i ús clínic, que fan inviable seva implementació en llocs remots on és gairebé impossible mantenir la cadena de fred [Zhang & Kong, 2008]. També s'ha descrit que la neu carbònica, utilitzada pel transport, redueix l'activitat biològica dels adenovirus degut a l'entrada de diòxid de carboni dins dels vials acidificant el pH del tampó, el que contribueix a dificultar una implementació a nivell clínic del adenovirus [Nyberg-Hoffman *et al.*, 1999; Ugai *et al.*, 2002]. A més, les formulacions tradicionals no són adequades per a l'ús humà degut a la naturalesa antigènica i la toxicitat potencial d'alguns components utilitzats. Per una banda, s'utilitza el glicerol, que tot i les nombroses avantatges, estudis recents han demostrat que aquest és capaç de travessar les membranes cel·lulars conduint a una hemòlisi dels eritròcits humans. Per reduir aquesta toxicitat es requereix d'una extensa dilució abans de l'administració [Reich *et al.*, 1995; Jumaa *et al.*, 1999]. Tanmateix, la tendència actual és reduir el risc i millorar la seguretat, de manera que eliminar el glicerol de les formulacions estabilitzadores d'adenovirus és un dels objectius que es volen assolir en aquest marc científic [Croyle *et al.*, 2001]. Per l'altra banda, està àmpliament reconegut que derivats animals com ara els sèrums són bons estabilitzadors, però la seva naturalesa antigènica els fa inviablés per a l'ús humà [Croyle *et al.*, 1998].

Tenint en compte la necessitat real de noves formulacions protectores, la comunitat científica està realitzant gran esforç per desenvolupar sistemes protectors que compleixin tan com sigui possible els criteris d'acceptació per al disseny d'una vacuna. Alguns d'aquests criteris són: (1) una solució líquida amb una estabilitat d'entre 18-36 mesos a temperatures d'entre $2-8^{\circ}\text{C}$ o superiors, (2) amb una estabilitat mínima a temperatura ambient per a permetre emmagatzematges i transports curts així com la seva manipulació sense refrigeració, (3) estable a diversos cicles de congelació-descongelació i (4) compatible a nivell parenteral en termes de tonicitat i acceptabilitat dels excipients [Evans *et al.*, 2004].

Tenint en compte els criteris esmentats, una formulació protectora líquida pot complir gran part dels criteris pel disseny d'una vacuna d'administració parenteral degut als avantatges que presenta en quant a cost, complexitat i fàcil administració. Tanmateix, gran part dels

mecanismes de degradació químics es produeixen mitjançant l'aigua, el que fa que una formulació líquida sigui làbil i alhora difícil de mantenir fixes les condicions desitjades. Tot i dissenyant una formulació líquida en la que es redueixi la degradació sota condicions d'emmagatzematge controlades, durant el transport molts cops no és viable controlar de forma precisa les condicions. Alternativament, la liofilització confereix la possibilitat de dissenyar formulacions més controlables i reproduïbles limitant la pèrdua de funcionalitat durant la fabricació, l'emmagatzematge, el transport i l'administració un cop s'han seleccionat els excipients adients i s'han optimitzat els paràmetres del cicle de liofilització [Wang, 2000]. A més, habitualment els productes liofilitzats permeten excursions de curta durada a temperatures controlades durant el transport sense danyar la seva integritat física i funcional. Així doncs, la liofilització és un opció atractiva en productes inestables o difícils d'estabilitzar en els que es desitja una estabilitat a llarg termini. S'han proposat alguns criteris a considerar per al disseny d'un producte liofilitzat: (1) El compost terapèutic ha de ser estable tant en la fabricació com el posterior emmagatzematge, a ser possible a temperatura ambient, (2) aquest ha d'estar compost per excipients aprovats per la FDA, (3) amb una aparença adequada i reproduïble, i (4) la preparació de la formulació líquida isotònica ha de ser fàcil i ràpida [Carpenter *et al.*, 1997; Lang & Winter, 2009].

1.4.1. Revisió de formulacions estables d'adenovirus

Actualment hi ha escasses investigacions en les que es descriguin formulacions líquides o liofilitzades d'adenovirus que permetin una estabilitat a llarg termini, entenent com a llarg termini una estabilitat de 1-2 anys com a mínim (Taula 1).

Durant el període de 1962-1992 es van desenvolupar nombroses investigacions per a estudiar la inactivació i desnaturalització dels virus sota estrès tèrmic. Es van identificar alguns factors rellevants en l'estabilitat tèrmica de la càpsida com ara el pH i també es va identificar el $MgCl_2$ com a bon estabilitzador [Wallis & Melnick, 1962; Melnick & Wallis, 1963]. Tanmateix, aquests estudis no tenien com a objectiu desenvolupar una formulació estable i per aquest motiu, hi ha una falta de correlació en les dades entre la inactivació tèrmica i l'estabilitat durant l'emmagatzematge. Això és degut a que el mecanisme predominant d'inactivació durant l'emmagatzematge i la inactivació tèrmica és diferent. Les vies d'inactivació són múltiples i intervenen de forma diferent a cada temperatura, una de les limitacions principals pel desenvolupament d'una formulació estable. Així doncs, la intervenció de múltiples factors d'estrès fa complicat fer una predicció a llarg termini a partir

d'una estabilitat a curt-termini en condicions accelerades, essent millor estudiar l'eficàcia d'una formulació amb estudis d'estabilitat de llarg termini, per tal de que els resultats siguin representatius de les condicions reals d'emmagatzematge. Les formulacions descrites en aquest període són emmagatzemades congelades sense avaluar l'estabilitat a 2-8°C. A més, aquestes s'havien formulat en glicerol i sacarosa pel seu ús històric com a crioprotectors [Altaras *et al.*, 2005].

A partir del 1998 es desenvolupen formulacions líquides amb una avaluació sistemàtica per determinar l'estabilitat a 2-8°C. La primera formulació líquida proposada deixa patent la baixa estabilitat del glicerol en refrigeració i es proposa la sacarosa com a crioprotector principal permetent una estabilitat d'un any a 4°C. No obstant, les concentracions de sacarosa eren elevades i feia que la formulació fós hipertònica, un fet poc desitjat per a l'administració parenteral on és preferible una solució isotònica [Sene *et al.*, 1998]. En aquest període, les dades acumulades d'estabilitat ja són més consistentes i compleixen la relació d'Arrhenius de 4°C a 37°C, de manera que els estudis a curt-termini en condicions accelerades poden ser útils per a fer prediccions d'estabilitat a llarg-termini a 2-8°C i poden servir com a guia per al desenvolupament i optimització de la formulació. Dos anys més tard, al 2000, es va desenvolupar una formulació estable 8.5 mesos a 4°C utilitzant l'albúmina humana (HSA) i la sacarosa com a estabilitzadors [Shih *et al.*, 2000]. Aquest grup d'investigadors és el primer en utilitzar l'HSA en l'estabilització d'adenovirus i s'introdueix la necessitat d'utilitzar albúmina recombinant per tal d'evitar excipient derivats d'animals.

En aquest punt, es va identificar la necessitat de conèixer els mecanismes principals d'inactivació de l'Ad5 per tal de poder realitzar una selecció racional d'excipients comunament utilitzats per estabilitzar proteïnes, DNA i virus, i un subseqüent cribratge empíric de les formulacions seleccionades. Croyle i Evans van fer grans esforços per identificar els factors principals que influencien l'estabilitat de l'Ad5: l'oxidació per radicals lliures, l'adsorció i el dany per congelació i descongelació [Croyle *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2004]. Un altre investigador també va desenvolupar formulacions líquides amb una estabilitat millorada permetent un manteniment complet de la funcionalitat durant 18 mesos a 4°C [Blanche *et al.*, 2000; Blanche *et al.*, 2001]. El grup de Frei va dissenyar una formulació estable amb sacarosa, glicerol i polisorbat 80 (PS-80) durant un any a 4°C [Frei *et al.*, 2003].

Alternativament, Kovesdi i els seus col·laboradors van desenvolupar una formulació molt similar en la que s'utilitzava la trehalosa i el NaCl en comptes de la sacarosa, i no contenia glicerol [Kovesdi *et al.*, 2003]. Un any més tard, es va desenvolupar una formulació líquida anomenada A195 que presentava una pèrdua de 0.1 log de la funcionalitat inicial en 24 mesos a 4°C. Aquesta formulació era significativament més estable perquè a part de contenir sacarosa i histidina, com a principals excipients estabilitzadors, també contenia inhibidors de l'oxidació per radicals lliures: etanol i EDTA [Evans *et al.*, 2004]. Altres grup universitaris i empreses com Stabilitech Biopharma també han desenvolupat formulacions amb una estabilitat millorada, però A195 és fins ara la formulació descrita més efectiva.

Paral·lelament, s'han desenvolupat formulacions liofilitzades, ja que les formulacions líquides tenen una estabilitat molt limitada per sobre dels 8°C [Peetermans, 1996]. Tot i que les condicions de refrigeració són més fàcils de mantenir que no pas les de congelació, implica que es mantingui la temperatura constant i no es trenqui la cadena de fred en el transport garantint l'efectivitat terapèutica. La liofilització és un procés car i allarga la durada de la fabricació del producte, però introdueix la possibilitat de reduir i desaccelerar els mecanismes de degradació mediats per l'aigua, ja que es pot reduir el seu contingut fins a un 1-2% del pes total. Una de les propostes va ser la de Croyle amb una formulació basada en sacarosa estable durant 1 any tret de la pèrdua inicial del 50% degut al procés [Croyle *et al.*, 1998; Croyle *et al.*, 2001]. Wu i Zhang van demostrar que la presència d'un agent de càrrega com el manitol, un crioprotector com la sacarosa per a la congelació i un lioprotector per a la congelació i la deshidratació, a més d'una correcta selecció del tampó, en aquest cas Tris, permetia l'estabilització d'adenovirus tan en estat líquid com liofilitzat [Wu & Zhang, 2004]. El grup de Cruz va proposar utilitzar el tampó Tris amb nous estabilitzadors procedents de extremòfils com són la firoina i la hidroxiectoina segons si la temperatura d'emmagatzematge era a 22°C o a baixes temperatures, respectivament. Més tard, Zhang i Kong proposaren una formulació amb 2% trehalosa, 1% manitol, 2% dextrà, 0,3% HSA i 2% sacarosa més protectora que les formulacions liofilitzades anteriorment proposades, on es demostrava que una bona selecció dels excipients pot fer que l'estrès introduït pel procés de liofilització sigui negligible i la pèrdua en l'emmagatzematge sigui del 60% a 17 mesos a 4°C [Zhang & Kong, 2008]. Tot i les nombroses avantatges de la liofilització enfront la formulació líquida, encara no s'ha reportat una formulació liofilitzada capaç d'assolir una estabilitat com a mínim equivalent a la descrita per Evans amb una pèrdua del 10% a 24

mesos a 4°C. Aquets fet possiblement és degut a una falta d'optimització tant de la concentració d'excipients com de la recepta del cicle de liofilització [Cruz *et al.*, 2006].

Taula 1. Llistat de formulacions líquides estables d'adenovirus on es descriu la composició i l'estabilitat a 2-8°C (Altaras *et al.*, 2005)

Referència	Formulació	Estabilitat 2-8°C
Sene <i>et al.</i> , 1998	10 mM Tris, 1M sacarosa, 150 mM NaCl, 1mM MgCl ₂ , 0.005% PS-80, pH 8.5	≥ 1 any
Shih <i>et al.</i> , 2000	10 mM Tris, 5% HSA, 5% sacarosa, 150 mM NaCl, 2mM MgCl ₂ , pH 8.4	≥ 8.5 mesos
Blanche <i>et al.</i> , 2000; Blanche <i>et al.</i> , 2001	20 mM Tris, 20% glicerol, pH 8.4	> 18 mesos
Croyle <i>et al.</i> , 2001	0.4% sacarosa, 0.4% manitol; 0.001% span 20	8.6 mesos
Hoganson <i>et al.</i> , 2002	Formulació GTS 20mM tris, 2.5% glicerol, 25 mM NaCl, pH 8.0	≥ 6 mesos
Frei <i>et al.</i> , 2003	14 mM Tris, 12 mM Na-PO ₄ , 2 mM MgCl ₂ , 2% sacarosa, 10% glicerol, 0.015% PS-80 pH 7.4 to pH 7.8	≥ 1 any
Kovesdi <i>et al.</i> , 2003	10 mM Tris, 5% trehalosa, 75 mM NaCl, 0,08 mM MgCl ₂ , 0.0025% PS-80, pH 7.8	33% de pèrdua en 1 any
Wu <i>et al.</i> , 2004	10 mM Tris, 5% sacarosa, 5% manitol, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 0,02% PS-80, pH 8.2	≥ 1 any
Evans <i>et al.</i> , 2004	Formulació A195 10 mM Tris, 10 mM Histidina, 5% sacarosa, 75 mM NaCl, 1 mM MgCl ₂ , 0.02% PS-80, 0.1 mM EDTA, 0.5% etanol, pH 7.4	10% de pèrdua en 2 anys

Així doncs, els esforços per identificar els factors rellevants en la inactivació dels adenovirus, i dels virus en general, així com els excipients més idonis i eficaços per a protegir-los són evidents. Fins al moment, la formulació A195 és la formulació coneguda més completa permetent una estabilitat de com a mínim 2 anys a 2-8°C i alhora excursions a curt termini a temperatures més elevades, fet necessari per a no posar en risc la integritat del producte si es trenca la cadena de fred.

Tot i així, la majoria de formulacions, inclosa la A195, han estat sotmeses a estudis d'estabilitat amb una concentració de partícules víriques (pv) d'entre 10^8 - 10^{11} pv/mL. Aquestes concentracions són petites per a una administració humana i requereix un volum total gran del producte per al tractament destinat, incrementant el cost del producte per usuari. Al mateix temps, limita la via d'administració parenteral, ja que al ser un volum gran no podria ser administrat de forma subcutània o intramuscular, i hauria de ser administrat de forma intravenosa per infusió. Alternativament, una millor opció seria dissenyar un producte amb una concentració superior reduint el volum necessari de producte. D'aquesta manera es facilita la seva administració que podrà dur-se a terme *a priori* per qualsevol de les vies d'administració parenteral. A més, es redueix la durada i el cost del cicle de liofilització..

Per sobre d'aquest rang de concentració s'ha reportat que l'estabilitat de l'Ad5 depèn de la concentració. Aquest fet pot semblar limitant, però això és degut a que les formulacions proposades han estat optimitzades per a treballar a concentracions més baixes on el mecanisme principal d'inactivació és l'adsorció. Si es vol dissenyar un producte a una concentració superior, s'haurà d'optimitzar una formulació que protegeixi enfront a l'agregació, el mecanisme d'inactivació probablement principal [Altaras *et al.*, 2005]. Tenint en compte que l'Ad5 es produeix òptimament a concentracions d'entre 10^{12} - 10^{13} pv/mL [Chillón & Bosch, 2014], una concentració de 10^{12} pv/mL és una concentració que pot ser assolida.

Addicionalment, una concentració elevada de proteïna augmenta la resistència a la desnaturalització en la congelació per la formació d'interfícies gel-aigua. I alhora, augmentar la proporció en massa proteïna-excipient acostuma a augmentar la Tg' i la Tc del producte final.

Precisament el fet que les diferents investigacions es duguessin a terme a diferents concentracions dificulta la interpretació de les dades i la seva comparativa, a no ser que s'utilitzin concentracions similars o bé, es demostrï que no afecta la concentració en el rang d'interès.

En aquest punt, una de les prioritats ha estat fer una revisió dels mecanismes estabilitzadors de les proteïnes així com dels factors que influeixen en l'estabilitat d'aquest complex macromolecular abans, durant i després de la liofilització. Aquest coneixement permetrà fer

una revisió dels excipients i aplicar un disseny racional modificant la formulació amb una estructura lògica amb l'objectiu d'optimitzar-la i assolir una estabilitat a llarg termini.

1.4.2. Mecanismes estabilitzadors de les proteïnes

Els mecanismes estabilitzadors de proteïnes són diferents durant la congelació, la deshidratació i l'emmagatzematge a llarg termini.

Un dels mecanismes principals d'estabilització en l'estat líquid és la interacció preferencial, és a dir, la proteïna interacciona preferentment amb l'aigua excloent l'excipient de la superfície de la proteïna (Figura 5). Això no significa que no hi hagi excipient unit a la superfície de la proteïna, però la concentració d'aquest a la superfície serà inferior que a la solució. Tenint en compte que l'estat natiu d'una proteïna està afavorit termodinàmicament, donat que l'àrea de superfície de l'estat desnaturalitzat és superior, la presència d'excipients preferentment exclosos estabilitzaran l'estructura nativa d'una proteïna [Carpenter *et al.*, 2002]. Els estabilitzadors que són exclosos de la superfície de la proteïna en solució, poden estabilitzar les proteïnes durant la congelació pel mateix mecanisme. Aquest fenomen de protecció és conegut com la crioprotecció. A part d'aquest mecanisme, trobem l'increment de la viscositat com a mecanisme estabilitzador restringint la reactivitat molecular. A la congelació es dona una concentració de soluts que deriva ràpidament en un augment de la viscositat. Aquesta concentració de soluts causa inicialment un augment de la velocitat de les reaccions químiques, però gradualment disminueix aquesta velocitat amb l'increment de la viscositat [Pikal, 1999].

Durant la liofilització, hi ha un procés d'assecat addicional a la congelació, on el mecanisme d'interacció preferencial ja no aplica, ja que en aquesta etapa s'elimina la capa protectora d'aigua que envolta la proteïna [Carpenter *et al.*, 1993; Crowe *et al.*, 1993; Allison *et al.*, 1996]. La protecció conferida en aquesta etapa és coneguda com a lioprotecció. Un dels mecanismes principals de protecció és la formació de cristall amorf durant la liofilització. Els materials amorfs són més similars estructuralment a un líquid que no pas els cristallins, el que permet un reemplaçament de l'aigua per excipients [Allison *et al.*, 1996, 1998]. Aquest mecanisme implica la formació de ponts d'hidrogen entre les proteïnes i els excipients per tal de satisfer el requeriment de ponts d'hidrogen dels grups polars de la superfície de la proteïna [Carpenter *et al.*, 1990, 1991]. Així doncs, els excipients actuen com a substituïts de l'aigua preservant l'estructura nativa de la proteïna. De manera que la

crystal·lització d'alguns components en la liofilització pot desestabilitzar la proteïna per la formació ineficient dels punts d'hidrogen. La diferència entre sucres en quant al nivell de protecció depèn parcialment de les diferències de l'abast per a la formació de punts d'hidrogen. Hi ha altres mecanismes protectors oferits per la presència de certs excipients augmentant la Tg' que promou en una millor estabilitat, o bé, inhibint la crystal·lització d'altres excipients durant la liofilització [Wang, 2000; Carpenter *et al.*, 2002].

Durant l'emmagatzematge a llarg termini els mecanismes protectors són similars als de la lioprotecció: la formació d'un cristall amorf, el reemplaçament d'aigua per excipients la formació de punts d'hidrogen entre els excipients i les proteïnes. La combinació d'aquests mecanismes permet preservar l'estructura nativa de les proteïnes resultant en una estabilitat millorada en estat sòlid [Crowe *et al.*, 1996, 1998]. D'altra banda, el fet que s'inhibeixi l'agregació durant la liofilització relacionada amb l'absorció d'aigua fa que augmenti la Tg i sigui possible una temperatura d'emmagatzematge superior.

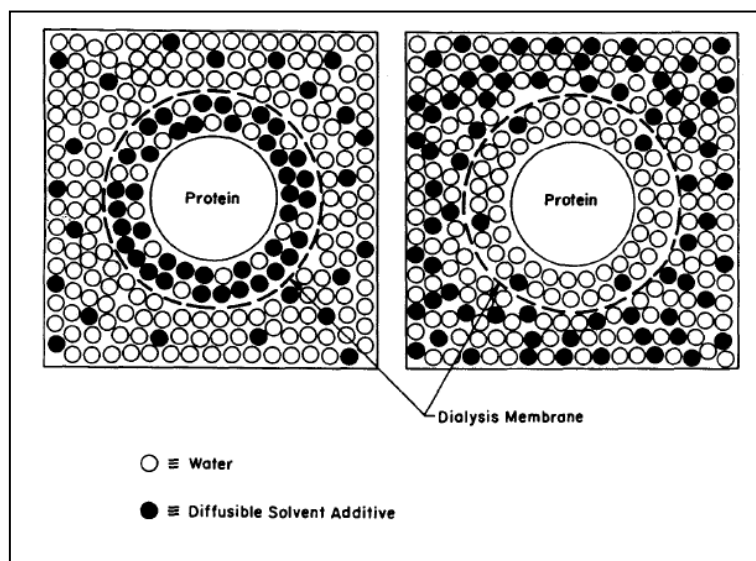


Figura 5. Representació esquemàtica del mecanisme d'unió preferencial al solut (esquerra) o d'exclusió preferencial del solut (dreta) (Bhat & Timasheff, 1992).

1.4.3. Factors involucrats amb l'estabilitat de l'Ad5

Hi ha múltiples factors involucrats en la estabilitat física i química de l'Ad5 i es donen en les diferents etapes del procés: en solució, durant la congelació o el procés d'assecat de la

liofilització, a l'emmagatzematge i inclús en l'administració. Cada un d'ells juga un paper diferent a cada formulació i és el sumatori de cada un dels efectes el que determina el resultat final en quant a l'eficiència estabilitzant (Figura 6). Partint de la base que l'Ad5 és un complex multiproteic, es poden donar modificacions químiques o canvis conformacionals en la seva forma nativa i biològicament activa donant lloc a una forma no-nativa i/o inactiva. Així doncs, cal formular l'Ad5 en un entorn que afavoreixi el manteniment de l'estructura secundària, terciària i quaternària de les proteïnes virals i inhibeixi les possibles modificacions químiques, ja que això serà el que determinarà la seva funcionalitat. Els factors més crític per a l'estabilitat es descriuen a continuació.

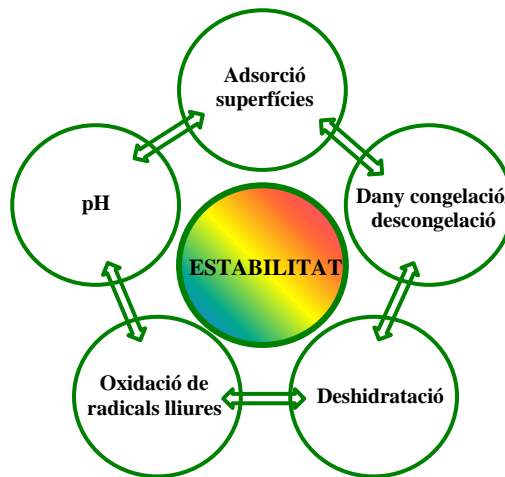


Figura 6. Els factors principals involucrats en l'estabilitat de l'adenovirus.

1.4.3.1. Temperatura

A l'any 1967 ja es va descriure la termolabilitat de la càpsida d'Ad5 a partir de 56°C, per aquest motiu la inactivació i ruptura de l'Ad5 es du a terme incubant a 56°C de forma rutinària [Russell *et al.*, 1967]. Recentment, l'avaluació de l'estabilitat de l'estructura de l'Ad5 ha suggerit que la càpsida pateix un desasseblatge en dues etapes. Durant l'estrès tèrmic de l'Ad5 es distingeixen dues transicions dirigides pels canvis d'estructura secundària, terciària i quaternària. La primera transició es detecta sobre els 50°C i comença per l'expansió de la càpsida amb el consegüent augment del radi hidrodinàmic, on el DNA queda parcialment exposat al solvent. Es detecta la ruptura d'alguns vèrtexs amb microscòpia electrònica de transmissió (TEM), és a dir, la pèrdua d'algunes proteïnes *fiber*. Es creu que aquesta pèrdua inicial de la *fiber* és acompanyada per la dissociació de *penton*,

fet que permet deixar accessible el DNA. Amb l'augment de la temperatura es contribueix en el procés de desestructuració on la proteïna *hexon* i IX es dissocien i el DNA queda totalment exposat. Aquesta segona transició es dona aproximadament sobre els 65°C. Totes aquestes pertorbacions estructurals resulten en l'agregació de proteïnes virals i en un complet desassemblatge de la càpsida [Rexroad *et al.*, 2002; Teschke *et al.*, 2003; Martin-Fernandez *et al.*, 2004; Maheshwari *et al.*, 2004; Rexroad *et al.*, 2005].

1.4.3.2. pH

La infecció de l'Ad5 requereix de la internalització cel·lular i aquest procés està associat a un procés de desassemblatge que s'inicia amb la pèrdua de la proteïna *fiber* i continua a l'endosoma on es requereix d'un pH àcid per a que es donin canvis estructurals i el virió parcialment desassemblat pugui ser translocat al citosol i arribar al nucli cel·lular [Greber *et al.*, 1993; Nakano *et al.*, 2000]. Així doncs, està establert que alguns components de la càpsida adenoviral són inestables a pH àcids. S'ha descrit que la proteïna *hexon* experimenta un canvi estructural a pH inferiors a 5.5 [Stewart & Burnett, 1995; Wiethoff *et al.*, 2000]. Aquest efecte multiplicat pel nombre total d'*hexons* permet alliberar la *penton base* i conseqüentment la *fiber*. Així doncs, es perd la capacitat d'unir-se a les cèl·lules i d'entrar en elles [Wickham *et al.*, 1994; Stewart *et al.*, 1995]. No obstant, recentment s'ha demostrat que un pH àcid incrementa l'estabilitat física de l'Ad5 tant en condicions d'alta força iònica com de baixa força iònica. La transició a 50°C esmentada anteriorment té lloc a temperatures més elevades, suggerint que s'inhibeix el canvi d'estructura terciària per un augment en el nivell de protonació. Així doncs, un pH àcid no és suficient per a dirigir el desassemblatge de la càpsida, però sí que redueix l'estabilitat de l'estructura quaternària així com augmenta l'agregació. Per tant, el pH àcid de l'endosoma contribueix en el desmantellament del virió, però no és suficient per al procés complet de desestructuració, ja que l'estabilitat tèrmica de l'Ad5 augmenta amb la disminució del pH [Rexroad *et al.*, 2005].

L'efecte del pH en l'estabilitat de l'Ad5 ha estat examinat en múltiples ocasions. Sene va reportar que en formulacions amb sacarosa i PS-80, l'Ad5 és més estable a pH 8.5-9.0 que a pH 7.4-8.0 [Sene *et al.*, 1998]. Tanmateix aquests estudis es van dur a terme a 37°C durant 72h i això no és suficient per extrapolar el comportament en emmagatzematge a llarg termini a 2-8°C. Croyle i els seus col·laboradors també van examinar l'efecte del pH a 37°C i a 4°C, però els estudis eren masses curts com per establir una tendència (Croyle *et al.*, 1998). De la mateixa manera va succeir amb els estudis del grup de Shih ens els que es va demostrar una

millor estabilitat en el rang de 8.0-8.6 només durant una setmana [Shih *et al.*, 2000]. El grup d'Evans va ser el primer en reportar una estabilitat a llarg termini de 24 mesos a 4°C on el rang òptim de pH era 6-7,6 [Evans *et al.*, 2004]. No obstant, la seva formulació candidata contenia PS-80 a més d'inhibidors de l'oxidació de radicals lliures, i en altres composicions el rang òptim pot ser diferent. A més, cal destacar que en el rang de pH proposat es mostra un clar increment de la termoestabilitat de la càpsida, però no hi ha un efecte significatiu en l'estabilitat durant l'emmagatzematge. Així doncs, l'estabilitat tèrmica de la càpsida no està relacionada amb l'estabilitat durant l'emmagatzematge a llarg termini almenys en aquestes formulacions i per tant, el rang idoni de pH cal estudiar-lo cas a cas.

D'altra banda, cal destacar la sensibilitat de l'Ad5 als canvis de pH. Habitualment les formulacions protectores en solució requereixen de l'emmagatzematge a temperatures de congelació com -20°C o -80°C, o bé, passen per un procés de congelació per a ser liofilitzades. En aquest canvi tèrmic es poden experimentar canvis de pH, ja sigui per la concentració de soluts en la congelació o per la precipitació d'alguns components. Així doncs, és important la selecció d'un tampó adequat, ja que la capacitat amortiguadora d'aquest determinarà la capacitat de resistir els canvis de temperatura. Els tampons més comuns són els tampons fosfats, com ara el tampó fosfat salí (PBS) i el Tris. El PBS és un tampó àmpliament utilitzat i acceptat en ús humà, però és poc efectiu en el manteniment de pH a temperatures de congelació, ja que alguns components dels tampons fosfats precipiten causant un canvi en la composició i una davallada del pH. L'addició de sals com ara el calci o el magnesi afavoreixen aquesta precipitació [Croyle *et al.*, 1998]. En canvi, el tampó Tris, preparat a partir de tris-hidroximetil-aminometà, és molt més eficient mantenint el pH. El seu efecte varia en funció dels crioprotectors presents en la formulació. A més, el perfil de degradació de productes liofilitzats i no liofilitzats formulats en tampó Tris no varien de forma significativa, el que afavoreix el procés complet de la fabricació d'un producte liofilitzat on la primera etapa de fabricació del producte es realitza en solució seguit d'una posterior liofilització. També s'ha reportat el paper del tampó Tris com a antioxidant atrapant els radicals hidroxil en solució, reduint així l'oxidació, un dels principals mecanismes de degradació en preparacions de virus liofilitzats [Chaillot *et al.*, 1981; Stanton *et al.*, 1993]. El Tris té capacitat tamponant a pH 7.5-8.5 en funció de la temperatura. No obstant, l'addició d'histidina permet aportar aquesta capacitat tamponant per sota de 7.5, a més d'actuar com a inhibidor de l'oxidació per radicals lliures [Wade & Tucker, 1998; Evans *et al.*, 2004]. S'han

descriu altres tampons efectius en l'estabilització de l'adenovirus com ara el tampó HEPES, però no està aprovat per ús en humans.

1.4.3.3. Força iònica

L'efecte de la força iònica en l'estabilitat de l'Ad5 ha estat un factor que ha generat controvèrsia en la comunitat científica [Yamamoto, 1967; Sprunck & Wigand, 1981]. Està àmpliament establert que una baixa força iònica, i per tant, una baixa concentració de sals, estabilitza les proteïnes mitjançant la reducció de la càrrega neta positiva de la macromolècula. Tanmateix, una alta concentració de sals sembla que aporta una estabilització mitjançant la hidratació preferencial de la macromolècula i l'exclusió preferencial de soluts de la superfície de la macromolècula [Arakawa & Timasheff, 1982; Carpenter *et al.*, 1991; Timasheff, 2002]. L'exclusió de les sals de la superfície proteica genera un entorn desfavorable termodinàmicament per a l'estat desnaturalitzat de la proteïna, ja que qualsevol altre estat augmentarà l'àrea de contacte amb el solvent. Així doncs, s'estabilitza l'estructura nativa de la proteïna desfavorint la desnaturalització o la dissociació. Aquesta controvèrsia ha dut a realitzar nombrosos estudis per identificar la millor manera de protegir la càpsida viral i sembla que la tendència és la d'establir el mecanisme d'hidratació preferencial com un dels mecanismes principals de preservar la seva conformació i activitat. Rexroad va observar que la presència de 1M NaCl afavoreix més l'estabilitat física de l'Ad5 que a la concentració de 0.075 M [Rexroad *et al.*, 2005].

1.4.3.4. Oxidació per radicals lliures

L'oxidació per radicals lliures és un procés important de degradació en formulacions farmacèutiques tant de proteïnes com d'àcid nucleics [Li *et al.*, 1995; Evans *et al.*, 2000]. Aquesta primera aproximació on l'oxidació es proposava com a potencial inactivador durant l'emmagatzematge va promoure la realització d'estudis d'estabilitat a curt termini per identificar formulacions protectores amb una estabilitat millorada a llarg termini mitjançant l'ús de potenciadors i inhibidors de l'oxidació. Evans i els col·laboradors van demostrar que l'ús d'inhibidors de l'oxidació com ara l'àcid etil-diamino-tetraacètic (EDTA) i l'etanol milloraven l'estabilitat de formulacions protectores susceptibles de ser bones candidates per a una estabilitat llarga. L'etanol a concentracions baixes actua amagant els radicals hidroxil, on la seva activitat es veu potenciada per l'addició d'EDTA obtenint un manera que hi ha un efecte sinèrgic [Evans *et al.*, 2004]. En canvi, l'addició de Fe^{+2} , Fe^{+3} i àcid ascòrbic

augmentava les pèrdues de funcionalitat, el que confirmava la sensibilitat de l'Ad5 a l'oxidació de radicals lliures dirigida per ions metàl·lics.

1.4.3.5. Estrès per la congelació/descongelació

La manipulació d'Ad5 purificat en moltes ocasions requereix de diversos cicles de congelació i descongelació. Aquest cicles afecten a l'estabilitat de l'Ad5 i és necessari afegir excipients crioprotectors que permetin estabilitzar la càpsida en solució i alhora durant la congelació i descongelació. S'ha descrit en nombrosos estudis que l'ús de cations divalents com el magnesi o el calci estabilitzen els virus [Casto *et al.*, 1966; Yamamoto, 1967]. Es creu que la unió del ió metàl·lic Mg^{+2} a la càpsida millora l'estabilitat tèrmica de l'Ad5 [Hannan *et al.*, 1983]. En quant als sucres, un dels més utilitzats és la sacarosa, de la qual s'ha demostrat que prevé del dany causat pel procés de congelació i descongelació, a més de millorar l'estabilitat de la càpsida sota un estrès tèrmic [Rexroad *et al.*, 2002]. I per últim, en el grup de poliols destaca el glicerol, però com s'ha comentat anteriorment, la tendència actual és a eliminar-lo per la seva toxicitat, el que ha dut a buscar-ne d'alternatius que oferissin propietats beneficioses com ara el manitol i el sorbitol.

1.4.3.6. Velocitat congelació

La velocitat de congelació també juga un paper important en l'estabilitat de l'Ad5, ja que afecta a la formació dels cristalls [Zhai *et al.*, 2004]. Una congelació ràpida dóna lloc a cristalls petits amb una estructura de porus petits i nombrosos evitant les crioconcentracions (concentració de solució a congelar) i la ruptura d'estructures cel·lulars. Aquesta estructura ofereix major resistència que el cristall gran al flux de vapor d'aigua en l'etapa d'assecat primari de la liofilització. Aquesta resistència allarga la durada de l'assecat primari. Tanmateix, aquesta estructura afavoreix la desabsorció en l'assecat secundari, ja que una superfície gran facilita la difusió cap a l'exterior de la humitat residual. Pel contrari, la congelació lenta dóna lloc a la formació de cristalls grans amb porus grans i poc nombrosos que faciliten la sortida de vapor d'aigua i acurten la durada de l'assecat primari, però dificulten la sortida de la humitat residual en l'assecat secundari, a més d'afavorir la crioconcentració. Per aquest motiu, una congelació ràpida és favorable en quant a la preservació de l'estructura de la càpsida i la funcionalitat, ja que provoca un estrès mecànic inferior. D'aquesta manera s'afavoreix el manteniment de la integritat física i funcional de la càpsida, fent que la concentració de partícules funcionals sigui superior que amb una

congelació lenta [Croyle *et al.*, 1998]. La composició d'excipients crioprotectors també intervé en la formació dels cristalls. Un sistema crioprotector ideal té la capacitat de canviar les propietats de congelació de l'aigua i modificar la naturalesa dels cristalls formant una matriu amorfa que previngui la formació de cristalls grans. Així doncs, tant la velocitat de congelació com la selecció dels excipients són crucials per al control de la mida dels cristalls i mantenir el producte estable biològicament.

1.4.3.7. Efecte de la concentració de soluts

La congelació d'una solució incrementa la concentració de soluts degut a la formació de cristalls. Així doncs, totes les propietats relacionades amb la concentració com ara la força iònica poden canviar. I aquests canvis poden desestabilitzar potencialment les proteïnes.

Tal i com s'ha descrit anteriorment, una congelació lenta afavoreix més la crioconcentració que no pas una congelació ràpida i per aquest motiu una congelació lenta també pot desestabilitzar la integritat física i funcional de la càpsida.

Generalment, la temperatura baixa redueix la velocitat de les reaccions químiques. No obstant, aquestes reaccions químiques poden accelerar-se en una solució parcialment congelada degut a l'increment de soluts [Pikal, 1999].

1.4.3.8. Formació d'interfícies gel-aigua

La congelació d'una solució genera interfícies gel-aigua i les proteïnes poden ser adsorbides perdent la seva estructura nativa resultant en una desnaturalització induïda. S'ha descrit que l'augment de la concentració de proteïna inicial incrementa la resistència a aquesta desnaturalització [Chang *et al.*, 1996c].

Una congelació ràpida genera grans interfícies i per tant, al haver una major àrea, la quantitat de proteïna adsorbida serà superior que si es du a terme una congelació lenta.

1.4.3.9. Adsorció a superfícies

L'adsorció a superfícies és un factor rellevant per l'estabilitat de l'Ad5 en solució. Una de les superfícies més comunes en el camp farmacèutic és el vidre, ja que els productes parenterals acostumen a estar envasats en vials d'aquest material. La presència de surfactants no-iònics en la formulació protectora ha mostrat una clara reducció de les pèrdues de partícules víriques. Alguns dels surfactants no iònics utilitzats són el polisorbitat 80 i el

polisorbat 20 [Ohtake *et al.*, 2011]. S'ha demostrat la contribució del polisorbat 80 en l'estabilització inhibint l'adsorció a superfícies, ja que l'addició d'aquest augmenta la concentració de partícules víriques lliures i conseqüentment la concentració d'unitats funcionals [Evans *et al.*, 2004]. En el cas del polisorbat 20, s'ha descrit la unió a les regions hidrofòbiques del compost terapèutic evitant la interacció amb superfícies hidrofòbiques o bé, la competició amb el compost per l'adsorció a les interfícies líquides com a mecanisme responsable del seu efecte inhibidor [Lang & Winter, 2009].

1.4.3.10. Deshidratació

El procés de liofilització millora l'estabilitat de les proteïnes, ja que elimina total o parcialment els factors d'estrès derivats de la presència d'aigua. No obstant, el procés d'assecat exposa a nous factors d'estrès, a part dels de la congelació, que causen pèrdues significatives de funcionalitat. Així doncs, mitigarà els factors relacionats amb l'aigua un cop s'hagi liofilitzat la formulació i per tant, es reduirà la pèrdua d'estabilitat durant l'emmagatzematge, però introdueix el procés d'assecat que també interfereix en l'estabilitat de l'adenovirus. De manera que caldrà fer una bona selecció dels excipients i una bona optimització del cicle de liofilització per a que el procés de liofilització aporti una avantatge significativa versus al procés de fabricació en solució.

Una proteïna en solució està totalment hidratada, i per tant, està coberta d'una monocapa d'aigua que recobreix tota la superfície. La pèrdua d'aquesta cobertura pot afectar a l'estructura nativa d'una proteïna i causar la desnaturalització. El procés d'assecat consisteix en una eliminació parcial de la coberta protectora d'aigua de les proteïnes i de les partícules víriques i aquest procés pot conduir a canvis conformacionals, o inclús la formació d'agregats [Prestrelski *et al.*, 1993]. Quan una proteïna hidratada s'exposa a un ambient pobre en aigua tendeix a transferir protons als grups carboxil ionitzats per a reduir les càrregues la proteïna tan com sigui possible. Aquest fet fa que disminueixi la densitat de càrrega facilitant la interacció proteïna-proteïna, per tant, l'agregació. L'addició de lioprotectors, especialment disacàrids com ara la trehalosa, mitiguen aquest processos derivats de l'assecament, i alhora al ser un bon crioprotector, també lidien amb els factors d'estrès introduïts per la congelació. Hi ha dos mecanismes proposats per al sistema protector d'un lioprotector: vitrificació o reemplaçament de l'aigua. La vitrificació consisteix en la formació d'una matriu vítria amorfa durant la liofilització que confereix estabilitat al virus disminuint o retardant els canvis conformacionals. El segon mecanisme

suggereix un reemplaçament dels ponts d'hidrogen entre l'aigua i les proteïnes del virus pels ponts d'hidrogen amb els excipients de la formulació.

1.4.3.11. Agregació de proteïnes

Les interaccions a escala molecular que dicten l'estructura plegada i l'estabilitat per una determinada seqüència d'aminoàcids són: (1) limitacions geomètriques pels enllaços químics, (2) la pèrdua o el guany d'entropia pel plegament o desplegament, (3) les repulsions electroestàtiques entre aminoàcids de la mateixa càrrega, (4) les atraccions electroestàtiques entre aminoàcids de càrrega oposada, (5) les interaccions de Van der Waals, (6) els ponts d'hidrogen i (7) les atraccions hidrofòbiques entre zones no-polars. La contribució de 1, 2 i 3 es resisteix al plegament, mentre que les interaccions 4, 5, 6 i 7 promouen el plegament. Així doncs, són les mateixes forces les que condueixen al plegament i a l'agregació, i per tant, el balanç de totes aquestes condueix a un petit nombre de possibles configuracions que proveeixen una estructura plegada amb una energia lliure significativament inferior a una estructura parcial o totalment desplegada. Per tant, qualsevol alteració de l'ambient en el que es troben les proteïnes a nivell de pH, força iònica, presència de soluts, adsorció, exposició a interfícies de cristall i aigua, entre d'altres pot ser causant d'un desequilibri que condueixi cap a un estat desplegat. Aquest és el fonament pel qual les proteïnes són estructures dinàmiques on s'alterna entre estructura plegada i una estructura desplegada [Roberts, 2014]. El fet que la proteïna adquireixi una conformació diferent ja sigui per desplegament o falta de plegament deixa exposats residus que formen enllaços no covalents entre monòmers donant lloc a agregats.

Hi ha múltiples vies d'agregació que poden coexistir donant lloc a diferents tipus d'agregats. En funció del tipus d'agregat, el procés d'agregació és més o menys fàcilment reversible. Actualment, és molt difícil de predir quin és el mecanisme prevalent amb una proteïna i unes condicions determinades, i alhora quin és el comportament d'una proteïna en un sistema donat. Tot i que existeixen evidències de com afecten els diferents factors, cap algoritme és capaç de fer una predicció acurada de l'impacte en l'estabilitat conformacional d'una proteïna en un solvent que no sigui només aigua.

La formació d'agregats és un procés comú en productes biofarmacèutics durant l'emmagatzematge, transport o l'administració, sobretot a causa de l'exposició de interfícies de cristall i aigua que deriven en la desnaturalització de les proteïnes i la consegüent inducció

de l'agregació. Aquesta agregació pot ser tan física com química, en funció de si es formen enllaços no-covalent o covalents, respectivament. De fet, l'agregació química més comuna és la formació de ponts disulfur [Chang *et al.*, 1992; Jones *et al.*, 2001].

Hi hagut evidències de que la presència d'agregats incrementa el risc a desenvolupar resposta immune, ja que aquests són difícilment desassociats *in vivo* i a més, reten part de l'estructura secundària i terciària de la proteïna nativa. El fet que no es conegui l'impacte de la seva presència a nivell immunològic, ha conduït a la cautela de les agències regulatòries exigint que les propietats i les quantitats d'espècies d'agregat siguin controlades, reproduïbles i monitoritzades. Així doncs, han de ser reportats com una impuresa del producte en les seves especificacions [Singh, 2010; Webster, 2013].

1.4.3.12. Degradacions químiques

Les degradacions químiques no han estat tan estudiades en estat sòlid com en solució. No obstant, algunes d'aquestes com ara la l'oxidació o la desamidació han sigut detectades durant l'emmagatzematge. L'oxidació més comuna és la de metionina degut a l'oxigen atmosfèric o bé, els grup sulfhidril de les cisteïnes formant ponts disulfur que condueixen a una agregació. En el cas de la desamidació es dóna freqüentment en asparagina o glutamina. No totes aquestes modificacions impliquen un impacte funcional en l'activitat proteica [Pikal *et al.*, 1992; Wu *et al.*, 1998; Wang, 2000; Carpenter *et al.*, 2002].

1.4.3.13. Temperatura d'emmagatzematge

La temperatura d'emmagatzematge és probablement un dels factors crítics durant l'emmagatzematge d'un liofilitzat. Una temperatura elevada accelera l'agregació física de proteïnes, ja que s'incrementa la mobilitat d'aquestes facilitant la interacció entre elles. També accelera les degradacions químiques com les desamidacions [Chang *et al.*, 1996a,c]. I d'altra banda, també afecta l'estabilitat proteica de forma indirecta. La proteïna en una formulació en estat sòlid està estabilitzada per mitjà de la fase amorfa, és a dir, la fracció de la formulació composta per components amorfs que es troben en un estat vítri amb certa flexibilitat. Una temperatura d'emmagatzematge inadequada pot causar la cristal·lització de components amorfs de la formulació, fet que alteraria l'ambient protector de la proteïna en l'estat sòlid trencant potencialment les interaccions proteïna-excipient establertes. Aquesta cristal·lització es dóna lentament a una temperatura d'emmagatzematge inferior a la T_g, la temperatura de transició vítria del liofilitzat, mentre que es dóna ràpidament per sobre de la

Tg [Sun, 1997]. Normalment la Tg de la formulació sòlida és positiva i per tant, en el cas de proteïnes termosensibles o en virus no acostuma a ser un inconvenient, ja que les temperatures d'emmagatzematge són baixes. En alguns excipients, aquesta cristal·lització és dóna en forma d'hidrats com en el cas de la trehalosa, i al captar aigua s'incrementa la Tg de la fase amorfa.

1.4.3.14. Humitat

La humitat final del producte depèn de la temperatura i duració de l'assecat secundari del cicle de liofilització on l'aigua no congelada és desabsorbida. Aquest és un paràmetre crític tant en l'aspecte de la pastilla liofilitzada com en l'estabilitat a llarg termini de l'adenovirus [Carpenter *et al.*, 2002]. La bibliografia suggereix que una baixa humitat final en el producte confereix major estabilitat, entre 1 i 4%, ja que l'aigua residual pot trencar les interaccions proteïna-excipient establertes en el cicle de liofilització interferint amb l'assemblatge protector creat, o bé, que l'excés d'aigua promogui una flexibilitat conformacional i alhora permeti mobilitzar possibles reactants facilitant la degradació química i fent que el producte perdi estabilitat [Bell *et al.*, 1995]. A més, l'increment de contingut d'aigua en una formulació liofilitzada redueix la Tg i com s'ha comentat anteriorment, no és desitjable. De manera que l'aigua actua indirectament conferint plasticitat reduint la Tg i alhora, directament com a reactant per a reaccions químiques. No obstant, un excés d'assecament pot promoure una desnaturalització i agregació fent que es perdi l'activitat funcional [Greiff, 1970; Greiff, 1971]. S'ha demostrat que l'adenovirus és sensible a la humitat i s'ha d'estudiar el rang d'humitat òptim per a un producte i recepta de liofilització determinada [Croyle *et al.*, 2001].

La humitat durant l'emmagatzematge pot variar degut a diversos factors com l'alliberament de la humitat dels taps, la cristal·lització d'excipients amorfs, o bé, l'alliberament d'humitat d'un excipient hidratat [Yu *et al.*, 1999].

1.4.3.15. Medi de reconstitució

L'etapa de reconstitució pot afectar l'estabilitat de l'adenovirus per diferents mecanismes. En primer lloc, una ràpida reconstitució amb aigua pot no permetre la rehidratació d'una proteïna liofilitzada tan lentament com en l'etapa de deshidratació de la liofilització. Això pot causar que no es recuperi l'estructura nativa causant una desnaturalització i/o agregació [Cleland *et al.*, 1993]. En segon lloc, el pH de la solució reconstituïda pot ser diferent al pH

de la solució inicial abans de liofilitzar per la pèrdua d'algun component en el procés de liofilització com ara el HCl, l'àcid acètic, entre altres [Strickley and Anderson, 1996; Hatley *et al.*, 1996]. Per últim, la temperatura del medi de reconstitució en cas de proteïnes termosensibles també és un factor crític [Hatley *et al.*, 1996].

1.5. DISSENY D'UNA FORMULACIÓ D'ADENOVIRUS

La formulació i obtenció d'un producte biofarmacèutic és un procés llarg de diverses etapes. La selecció d'excipients així com la quantitat i proporció entre ells, a més del disseny d'un cicle d'optimització adequat per a la formulació candidata són les dues primeres fases dels desenvolupament. Totes dues estan interrelacionades i requereixen d'una optimització en paral·lel. A mesura que es duu terme aquest desenvolupament i posada a punt de la fabricació, cal dur a terme estudis d'estabilitat de la solució i del liofilitzats a curt i llarg termini per tal d'avaluar l'efectivitat de la formulació així com de l'impacte de les condicions del cicle establert. Aquest fet implica la decisió dels paràmetres control i els mètodes analítics que determinaran l'efectivitat d'aquesta formulació. Per aquest motiu és important establir un esquema del procés global i dels criteris desitjats en el producte final. Cal definir: (1) la via d'administració del producte, ja que si és de tipus parenteral, caldrà una solució isotònica composta d'excipients que hauran de ser acceptats per a ser administrats per aquesta via i d'una puresa i qualitat elevada, (2) la forma farmacèutica, ja que no són els mateixos factors d'estrès als que s'exposa una formulació líquida i una liofilitzada, (3) la concentració de producte i el volum dosificat, (4) el tipus de vial utilitzat, (5) l'estabilitat mínima necessària a temperatura ambient de la formulació líquida per a tenir una finestra de seguretat en el procés de fabricació, entre altres. Hi ha altres factors rellevants com la humitat final del producte que es definirà un cop realitzada la correlació entre la humitat i la funcionalitat en la formulació candidata i es pugui seleccionar el rang òptim.

1.5.1. Selecció d'excipients

Un cop establerts els criteris en els que volem que el procés del nostre producte es desenvolupi, cal seleccionar els excipients idonis per a la protecció del producte.

Els excipients també són anomenats additius [Li *et al.*, 1995], co-soluts [Arakawa *et al.*, 1993] i co-solvents [Timasheff, 1993, 1998]. Aquests són el component majoritari, sobretot

en productes de caràcter biològic on el percentatge de molècula activa és molt baix. Clàssicament es coneixen com a ingredients inerts i inactius per distingir de la molècula activa que es vol estabilitzar. No obstant, actualment s'utilitzen excipients que no són inerts com ara proteïnes com la HSA com a excipient actiu. En aquest cas, és l'agència reguladora de cada país la que estableix quins excipients poden ser utilitzats per a cada via d'administració.

Aquests s'afegeixen a les formulacions protectores amb diferents propòsits, ja sigui controlar el pH, assolir la isotonicitat, reduir l'estrès en la congelació i el procés d'assecat de la liofilització o evitar la desnaturalització, entre altres. Hi ha excipients que interaccionen amb la proteïna per unió directa, però molts altres com ara el sucres utilitzen mecanismes basats en la unió indirecta. Aquesta interacció indirecta regida pel fonament d'hidratació preferencial és un dels mètodes més efectius en la preservació de l'estabilitat de l'Ad5 [Arakawa *et al.*, 1991; Rexroad *et al.*, 2002]. No obstant, s'ha de considerar que si el producte es liofilitza, tota interacció indirecta que sigui mitjançada per aigua serà irrellevant, ja que l'aigua no hi serà present. De manera que seran els excipients que interaccionen directament amb la macromolècula els que determinaran les propietats del producte final [Ohtake *et al.*, 2011].

En aquest cas en el que es dissenya una formulació liofilitzada d'Ad5 per a via parenteral hi ha una única estratègia, ja que el producte ha de ser estèril, lliure d'agent pirògens, en absència d'agregats o amb un mida de partícula ben controlada, on els excipients han d'estar acceptats per la FDA i han de ser d'una puresa elevada. No obstant, el fet que estiguin acceptats per la FDA, només incrementa la seguretat, però no ho assegura, ja que la combinació amb altres excipients pot tenir un efecte tòxic potenciador o sinèrgic. Si un excipient o combinació d'excipients són nous i no han estat testats, caldran estudis addicionals per a garantir la seguretat del producte. En canvi, si un excipient o una combinació d'excipients ja ha estat aprovat en un injectable, caldrà aportar menys informació. Alhora s'haurà de considerar que aquests excipients millorin o com a mínim mantinguin la qualitat, l'estabilitat i l'efectivitat del producte, que siguin compatibles amb el sistema d'empaquetat primari i amb el procés de fabricació, que permetin al producte adquirir una aparença acceptable i reproduïble, i alhora que la reconstitució del producte final per adquirir una solució isotònica o propera a la isotonicitat sigui ràpida i senzilla [Lang & Winter, 2009; Pramanick *et al.*, 2013].

A més, en el disseny d'una formulació liofilitzada, la selecció d'excipients ha de tenir en compte els factors d'estrès que introdueix la liofilització, és a dir, ha d'estar en consonància a les necessitat marcades pel procés. En el cas de la primera etapa del procés, la congelació, cal tenir en compte principalment l'exposició a superfícies de cristall i aigua, l'efecte de la concentració de sals i soluts, els canvis de pH i l'estrès mecànic generat per la formació de cristalls, tal i com s'ha comentat anteriorment. Mentre que en l'etapa d'assecat, l'eliminació de l'envolta protectora d'aigua és el mecanisme de degradació principal. I simultàniament, cal dissenyar la formulació tenint en compte que ha d'aportar una protecció suficient en solució, és a dir, que permeti un mínim d'estabilitat líquida idealment a temperatura ambient abans de que sigui liofilitzat el producte. Així doncs, cal un estabilitzador que sigui crioprotectors i alhora o lioprotector. En cas que un excipient no protegeixi en ambdues situacions, caldrà afegir més d'un estabilitzador.

Els excipients necessaris per a una formulació liofilitzada podren ser classificats en 5 categories: tampons, estabilitzadors, agents ajustadors de la tonicitat, antioxidants i agents de càrrega.

1.5.1.1. Tampons

Els tampons són utilitzats per ajustar i estabilitzar el pH, a més d'optimitzar la solubilitat i l'estabilitat del producte. Per a preparacions parenterals, el pH ha de ser proper al pH fisiològic. Com ja s'ha esmentat anteriorment, durant la congelació es dona un canvi tèrmic i aquest pot anar associat amb una davallada de pH si hi ha una concentració de soluts o la precipitació d'algun component. Així doncs, coneixent l'efecte d'un pH àcid sobre l'estructura de la càpsida i l'impacte de les fluctuacions de pH, és important la selecció d'un tampó a una concentració determinada del qual no precipitin components i sigui estable sota les diferents condicions tèrmiques del procés de liofilització.

1.5.1.2. Sucres i poliols

La selecció d'un bon estabilitzador requereix d'una bona protecció durant la liofilització i emmagatzematge a llarg termini. Per tant, cal que sigui parcialment amorf per a poder reemplaçar l'aigua i formar ponts d'hidrogen amb la proteïna. Els sucres i els poliols han estat històricament utilitzats com a crioprotectors i lioprotectors. Alguns exemples són la sacarosa, la trehalosa, la glucosa, la lactosa, el glicerol, el manitol i el sorbitol, entre altres [Carpenter *et al.*, 1990].

De 5 a 100 mM ni la trehalosa ni la glucosa protegeixen de manera significant en algunes proteïnes durant la liofilització. Per determinar la mínima concentració necessària per oferir el màxim efecte estabilitzador, Tanaka i col·laboradors van estudiar l'efecte lioprotector dels sucres en la catalasa [Tanaka *et al.*, 1991]. Van demostrar que els sucres protegeixen a la proteïna interaccionant directament formant una monocapa a la superfície. Per tant, la concentració mínima serà aquella que aportí un nombre de molècules suficient per aconseguir una monocapa i assolir la màxima protecció. I per tant, no és tan important la concentració d'excipient com la proporció entre aquest i la proteïna. No obstant, una concentració de 0.3M va ser descrita com la mínima per a assolir un efecte estabilitzador significant [Arakawa *et al.*, 1993]. Un cop assolit el nivell màxim de protecció a una determinada concentració de sucre o poliòl, pot ser que ja no es millori l'estabilitat si la concentració augmenta [Allison *et al.*, 1998], o bé, pot succeir que a partir de una concentració determinada s'afavoreixi la desestabilització i hi hagi una disminució gradual de la funcionalitat [Carpenter & Crowe, 1989]. Cal estudiar cas a cas, ja que el nivell de protecció assolit pels diferents sucres i poliòls pot ser igual o diferent en funció de la composició de la formulació, la concentració i propietats de l'estabilitzador, així com la compatibilitat amb la proteïna.

Els disacàrids no reductors com la sacarosa i la trehalosa formen de forma efectiva una fase amorfa en estat sòlid, fet que els situa com a principals estabilitzadors de proteïnes liofilitzades [Carpenter *et al.*, 1997]. De fet, aquest han estat adoptats com a crioprotectors per la natura, ja que els organismes anhidrobiòtics amb continguts d'aigua molt reduïts, contenen altes concentracions d'aquests [Crowe *et al.*, 1992, 1998]. Aquests són la millor opció per a protegir proteïnes terapèutiques perquè protegeixen enfront la congelació i la deshidratació, són no-reductors, tendeixen a mantenir-se amorfs durant la liofilització i estan aprovats per a productes parenterals. En comparació amb la sacarosa, la trehalosa té una Tg' superior i això permet prevenir de la formació de cristalls i mantenir la plasticitat de la fase amorfa, el que facilita obtenir una estructura adequada en la pastilla liofilitzada. Aquesta és més resistent a la hidròlisi àcida que genera sucres reductors que poden desestabilitzar les proteïnes per les reaccions de Maillard [Li *et al.*, 1996]. A més, la trehalosa és menys higroscòpica, el que permet més flexibilitat per a formar ponts d'hidrogen amb les proteïnes i una reactivitat química inferior. Les avantatges de la trehalosa fan que aquesta sigui escollida preferentment. Tot i que s'ha descrit que en alguns casos, la sacarosa sembla més efectiva en la inhibició del desplegament de les proteïnes en la liofilització perquè la

trehalosa es propensa a separar fases de polímers i proteïnes durant la liofilització [Allison *et al.*, 1999]. L'efecte estabilitzador d'aquest dos sucres dependrà de la proteïna involucrada i la concentració d'aquests. En alguns casos, els sucres no són suficients i requereixen de l'addició d'altres excipients com ara ions metàl·lics amb els que poden tenir un efecte sinèrgic estabilitzant de la proteïna.

Cal tenir en compte, que la protecció durant la congelació depèn de la concentració del sucre. Si la proteïna és làbil habitualment es requereixen concentracions superiors a 5% (p/v) per maximitzar l'estabilització [Carpenter *et al.*, 2002]. No obstant, la quantitat d'excipient normalment ve dictada per la concentració requerida per inhibir el desplegament en la deshidratació que depèn principalment de la proporció en massa entre el sucre i la proteïna. En funció de la proteïna i la formulació, la proporció adequada pot ser diferent. Així doncs, caldrà optimitzar la concentració del sucre en cada cas. Normalment la concentració adequada per la deshidratació és suficient per a conferir protecció durant l'emmagatzematge, sempre i quan el liofilitzat resultant tingui una Tg per sobre de la temperatura d'emmagatzematge [Carpenter *et al.*, 1997].

1.5.1.3. Agent de càrrega

Habitualment es requereix d'un agent de càrrega cristal·lí en la formulació sòlida per assolir com a mínim alguna de les següents funcions: (1) per conferir un suport mecànic a la pastilla liofilitzada, (2) per millorar l'aparença i assolir un aspecte homogeni i elegant, (3) per millorar la dissolució i/o (4) prevenir el col·lapse del producte (estovament de la formulació fins al punt que no és capaç de mantenir la seva estructura i perd l'estructura macroscòpica).

Aquest ha de ser soluble, compatible amb la proteïna, no tòxic i ha de tenir una Te elevada per a l'eficiència de la liofilització.

Si el producte té una massa relativament baixa de proteïna, cal utilitzar un agent de càrrega per a prevenir la pèrdua de la proteïna durant la liofilització i alhora per a formar una estructura adequada de pastilla essent aquesta robusta i elegant. És important la correcta formació de la pastilla, ja que aquesta marcarà la formació adequada dels porus, el que permetrà la sortida de vapor durant l'assecat [Pramanick *et al.*, 2013].

Dos agents de càrrega àmpliament utilitzats són el manitol i la glicina. Tots dos cristal·litzen durant la liofilització. Sobretot en el cas de la glicina interessa que gran part estigui

crystal·litzada, ja que aquesta té una T_g' baixa. Tenint en compte que la T_g' és la mitjana en massa de la T_g' de cada un dels component amorfs, si crystal·litza la glicina, es redueix la seva presència en la fase amorfa, per tant, augmenta la T_g' i permet un assecat més ràpid i econòmic [Carpenter *et al.*, 1996, 1997]. En ambdós casos, a vegades es requereix una etapa d'escalfament, anomenada *annealing*, una subetapa de la congelació en la que es puja la temperatura lleugerament per sobre de la T_g' i es manté durant unes hores per assegurar la crystal·lització. Un cop assolit l'efecte desitjat, es disminueix la temperatura de nou abans d'iniciar l'etapa d'assecat primari.

Si una fracció de l'agent de càrrega roman amorfa durant la liofilització, pot haver problemes per assolir una estructura adequada del liofilitzat i alhora, hi ha el risc potencial de que crystal·litzi durant l'emmagatzematge. Una manera d'evitar aquesta crystal·lització és la implementació de una etapa d'*annealing*. Alternativament, es pot ajustar la concentració de l'agent de càrrega o reduir la humitat residual tan com sigui possible [Carpenter *et al.*, 1997]. Per tant, la selecció de l'agent de càrrega i la seva quantitat és crítica, ja que la presència d'aquests redueix la T_g' .

1.5.1.4. Polímers

Aquests han estat utilitzats per estabilitzar proteïnes en solució i alhora, enfront a la congelació i la liofilització. Un dels polímers més utilitzats és l'albumina sèrica. A concentracions entre 0.05 i 0.1 % (p/v) ja permet inhibir l'adsorció a superfícies i en general estabilitza enfront al procés de liofilització. No obstant, actualment degut a les preocupacions per les potencials contaminacions de patògens, s'està instaurant l'ús d'albumina humana recombinant (rHSA) com alternativa [Tarelli *et al.*, 1998]. Hi ha altres polímers com ara el dextrà, el PEG, l'hidroxipropil-metil-cel·lulosa i la gelatina.

L'estabilització de proteïnes per polímers pot venir donada per un o més dels mecanismes següents: exclusió preferencial, per impediment estèric de la interacció de proteïna i/o per l'increment de la viscositat de la solució que limita el moviment. D'alguns polímers com el dextrà s'ha descrit que augmenten la T_g' i inhibeixen la crystal·lització d'excipients petits com la sacarosa degut a l'increment de viscositat. En altres casos, la presència de PEG o dextrà evita una baixada de pH evitant la crystal·lització de components del tampó fosfat [Carpenter *et al.*, 2002].

1.5.1.5. Surfactants

Com ja s'ha esmentat anteriorment a l'apartat 1.4.3.8, la formació d'interfícies gel-aigua durant la congelació pot causar la desnaturalització de proteïnes. L'addició de surfactants pot disminuir la tensió superficial de les solucions de proteïnes reduint l'adsorció a superfícies i/o l'agregació a les interfícies.

Els surfactants són molècules amb una part hidrofòbica i una part hidrofílica i es classifiquen segona la càrrega del grup polar en: aniònics, catiònics, no-iònics i zwitteriònics. Normalment per a l'estabilització de proteïnes s'utilitzen els surfactants no-iònics, ja que els iònics poden unir-se als grups polars o no-polars de les proteïnes causant la desnaturalització [Wang, 1999]. Un dels més utilitzats és el polisorbitat 80 o Tween 80. S'ha descrit a diferents estudis que a concentracions equivalents o superiors a 0.01% (p/v) ja protegeix enfront a l'agregació [Chang *et al.*, 1996b].

Així doncs, els surfactants han estat reportats com a bons estabilitzadors durant la liofilització. Tanmateix, no s'ha demostrat que aquests siguin capaços d'estabilitzar de forma efectiva durant l'emmagatzematge a llarg termini [Wang, 2000].

1.5.1.6. Ions metàl·lics

Els ions metàl·lics poden protegir durant la liofilització. En la presència de sucres, els ions metàl·lics divalents milloren la recuperació d'activitat d'una manera concentració-dependent. S'ha descrit l'efectivitat relativa aparentment d'aquests: $Zn^{+2} > Cu^{+2} > Ca^{+2} > Mn^{+2} > Mg^{+2}$ [Carpenter *et al.*, 1987].

Un gran nombre de virus són protegits enfront a la inactivació tèrmica amb l'ús de cations divalents, sobretot el Mg^{+2} . La inclusió de $MgCl_2$ a les formulacions d'Ad5 està basada en estudis inicials en els que la formulació protectora el contenia. No s'ha reportat posteriorment que l'estabilitat de l'Ad5 es vegi afectada per la presència o absència d'aquest. No obstant, una concentració d' 1mM de $MgCl_2$ incrementa lleugerament la temperatura de fusió indicant que els ions de Mg^{+2} interaccionen amb la càpsida estabilitzant-la sota condicions d'estrès tèrmic a altes temperatures [Hannan *et al.*, 1983; Shih *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2004].

1.5.1.7. Agents ajustadors de tonicitat

Les formulacions parenterals han de ser isotòniques amb el plasma humà per a evitar cap dany tissular. Per tant, a vegades és necessari addicionar components que ajustin aquesta tonicitat com ara la dextrosa, el glicerol, el clorur de sodi, el manitol o la glicina.

1.6. SELECCIÓ DE L'ENVÀS PRIMARI: el vial i el tap

La selecció del contenidor utilitzat per a les formulacions és tan important com la selecció d'excipients, ja que el material ha de ser compatible amb la formulació i el producte, sobretot quan està en estat líquid, és a dir, abans de la liofilització i en la reconstitució. La idoneïtat d'un material s'ha d'avaluar cas a cas [Burke *et al.*, 1992].

Habitualment el vidre de borosilicat tipus I és l'opció escollida, ja que és un material amb una alta resistència química i tèrmica, a més d'un baix nivell de lixiviació de ions metàl·lics. No obstant, en molts casos hi ha una pèrdua de funcionalitat o efectivitat degut a l'adsorció de proteïnes a la superfície del vidre i a la lixiviació de l'envàs primari. En els casos on el producte és sensible, existeix el borosilicat tipus I plus de Schott. Aquest material és més car, però té un recobriment intern de SiO₂ unit covalentment i no porós que redueix al mínim la interacció entre el producte i la superfície de l'envàs. De manera que es minimitza l'adsorció i es perllonga l'estabilitat del producte. Paral·lelament, hi ha propostes específiques de vials destinats a productes liofilitzats com ara el vial *TopLyo* d'Schott que tenen un recobriment hidrofòbic de Si-O-C-H que facilita la formació correcta de la pastilla i minimitza el volum residual després de la reconstitució. Aquests materials són més cars i no sempre cal utilitzar-los, cal avaluar cas a cas la idoneïtat d'un material [Burke *et al.*, 1992].

En quant a la mida del vial, dependrà del volum a dosificar. Per al procés de liofilització és recomanable que la solució dosificada representi un volum d'entre el 20% i el 50% del volum del vial. Un volum relativament petit permet que la liofilització sigui més eficient.

D'altra banda, cal seleccionar el tap. Aquest afecta significativament en l'estabilitat durant l'emmagatzematge degut a la transferència d'aigua del tap al producte [Ford & Dawson, 1994]. El tap absorbeix humitat durant el procés d'esterilització per autoclavat degut a l'elasticitat del tap i aquesta humitat pot ser cedida al producte durant l'emmagatzematge

[Corveleyn *et al.*, 1997]. L'augment d'humitat dependrà de la higroscopicitat i la quantitat de proteïna en la formulació. De fet, aquest procés s'ha descrit en múltiples estudis d'estabilitat [Chang *et al.*, 1996a; Kreilgaard *et al.*, 1999]. Hi ha diferents tipus de taps, de butil o halo-butil, especialment els de clorobutil i bromobutil són habitualment escollits per la baixa absorció d'humitat. Una estratègia per a reduir la humitat absorbida pel taps és dur a terme un assecat a 135°C durant 5h després de l'autoclavat. Cal tenir en compte que un excés d'assecat, pot causar l'efecte contrari, en el que s'absorbeixi la humitat del liofilitzat. També existeixen diferent tipus de films de superfície per millorar la compatibilitat del tap amb el producte així com per reduir el nombre de partícules visibles i subvisibles. Així doncs, la selecció del tap també requereix d'un estudi específic, però és habitual partir d'un tap de baixa absorció i en l'optimització del procés realitzar un canvi si fos necessari.

2. OBJECTIU

L'ús dels adenovirus s'ha establert d'una forma consolidada en el camp de teràpia gènica per diverses avantatges intrínseques. No obstant, la seva termoestabilitat continua essent a dia d'avui la limitació principal per a la seva aplicabilitat i màxima explotació del seu potencial. Actualment, hi ha només disponibles formulacions que la garanteixen a llarg termini a temperatures de -80°C , el que dificulta molt la seva manipulació per la incapacitat de mantenir la cadena de fred. Així doncs, es fa evident la necessitat de dissenyar una formulació farmacèutica que garanteixi l'estabilitat del virus a temperatures superiors a les actualment assolides com ara -20°C o 5°C preservant la seva activitat biològica. Una formulació líquida és més adequada en termes de cost, complexitat i fàcil administració, però l'aigua està implicada en moltes vies de degradació que fan que la formulació líquida sigui més làbil i difícil de mantenir fixes les característiques desitjades. Alternativament, la liofilització confereix l'oportunitat d'assolir formulacions més controlables i reproduïbles.

Així doncs, l'objectiu del projecte és el desenvolupament d'una formulació i forma farmacèutica liofilitzada estable per Ad5 que pugui ser vàlida com a plataforma per a estabilitzar els adenovirus. S'haurà de dissenyar una formulació capaç de conferir una estabilitat a curt termini en estat líquid que garanteixi la robustesa del procés de fabricació i una estabilitat a llarg termini en estat sòlid a temperatures de -20°C o 5°C . La composició de la formulació s'adequarà en termes de qualitat i puresa a l'administració parenteral, essent aquesta la via d'administració més restrictiva. Alhora, serà necessari posar a punt el cicle de liofilització que optimitzi al màxim l'efectivitat de la formulació candidata.

Per tal d'avaluar la idoneïtat de les formulacions estudiades serà necessari establir els paràmetres adequats així com posar a punt els mètodes analítics requerits. I la modificació de les formulacions en base a un disseny racional requerirà de la identificació dels atributs crítics així com de l'impacte d'aquests a nivell funcional i proteic.

3. MATERIAL I MÈTODES



3.1. PRODUCCIÓ DELS ESTOCS VÍRICS D'AD5

El procés de producció es va dur a terme a petita escala a les instal·lacions col·laboradores, però principalment es va externalitzar a la Unitat de Producció de virus (UPV) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB) on s'ha dut a terme amb els protocols estandarditzats vigents.

3.1.1. Amplificació del vector recombinant d'Ad5

Es va utilitzar un vector recombinant d'Ad5 proporcionat per VCN Biosciences propagat amb una línia cel·lular HEK293 (CRC 1573, ATCC) sota els estàndards d'un nivell de bioseguretat 2. Les cèl·lules s'han mantingut amb medi DMEM (Gibco) suplementat al 10% amb FBS (Thermo Scientific) a l'incubador a 37°C i un 5% de CO₂. L'amplificació i transfecció de les cèl·lules es va realitzar a una escala de 20 plaques de 15 cm en la majoria d'estocs vírics. Les cèl·lules es van recollir en tubs de centrifuga (Corning) de 50 mL i es van sotmetre a 3 cicles de congelació-descongelació per a llisar les cèl·lules i alliberar el virus [Chillón & Bosch *et al.*, 2014].

3.1.2. Purificació del vector recombinant d'Ad5

La purificació del llisat cel·lular es va realitzar seguint els protocols clàssics de gradients de CsCl. Es va realitzar un primer gradient discontinu de 1.25 g/mL de CsCl i 1.4 g/mL de CsCl en tubs de centrifuga Ultra-clear SW32. Es va centrifugar en rotor Beckman SW32 durant 1h 42min a 125.500 xg a 18°C. Posteriorment, amb les bandes recuperades de virus es va realitzar un segon gradient de 1.34 g/mL de CsCl en tubs de centrifuga pel rotor Ti SW40 durant 22h a 155.000 xg a 18°C. Un cop centrifugat es recupera el virus purificat i es va realitzar un dessalat i canvi de formulació amb columnes PD-10 Sephadex G-25M (GE Healthcare) seguint les instruccions del fabricant [Chillón & Bosch, 2014]. La formulació d'excipients va ser filtrada per una unitat de filtració Millex-GV de PVDF (Merck) de 0.22 µm sota campana de flux laminar i la seva composició ha depès de les necessitats puntuals del projecte. L'estoc víric purificat es va emmagatzemar en criovials o tubs de centrifuga de baixa retenció proteica i estèrils (Corning) de 15 mL segons les necessitats. Es conserven a -80°C.

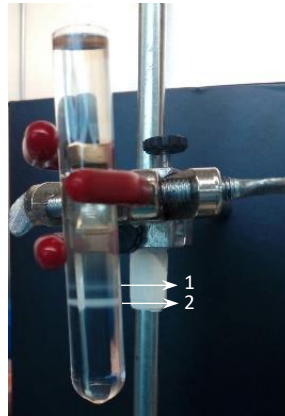


Figura 7. Primer gradient de la purificació d'adenovirus en la que es pot visualitzar la separació de les bandes de càpsides d'adenovirus buits (1) i càpsides d'adenovirus madurs (2).

3.2. CARACTERITZACIÓ DELS ESTOCS VÍRICS

Els estocs vírics es van caracteritzar en termes de concentració de partícules d'Ad5 físiques i funcionals per tal de tenir un valor de referència a partir del qual fós possible formular el lot i avaluar les pèrdues que experimentava al llarg del procés de fabricació i durant l'emmagatzematge. Aquesta caracterització es va dur a terme periòdicament per tal d'estudiar l'estabilitat de l'estoc i conèixer l'efectivitat protectora de la formulació en solució.

3.2.1. Concentració de partícules víriques (pv/mL) per espectrofotometria - Títol físic

La concentració de partícules d'adenovirus es va determinar mitjançant espectrofotometria degut a que les proteïnes absorbeixen a 277 nm i el DNA de doble cadena té el seu màxim d'absorció a 260 nm. Així doncs, la densitat òptica a 260nm (OD_{260}) en presència d'un detergent iònic com l'SDS és proporcional a la concentració de partícules d'adenovirus [Maizel *et al.*, 1968]. Es va utilitzar l'equip Nanodrop Lite (Thermo Scientific) per a determinar l' OD_{260} . A partir d'una solució de lisi 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA, 0,1% SDS (p/v) es van preparar tres dilucions de la mostra d'adenovirus, generalment les dilucions 1:5, 1:10 i 1:20. Per assegurar l'exactitud de la mesura, l' OD_{260} d'aquestes



dilucions havia d'estar dintre del rang 0.1-1. En cas contrari, es van realitzar noves dilucions que complissin el requisit. A partir de les tres lectures es va fer el càlcul atenent el factor de dilució aplicat i que una OD₂₆₀ de 1 correspon a una concentració de 1.1×10^{12} partícules víriques/mL (pv/mL). Es va realitzar el promig de les tres concentracions i aquesta havia de complir que el CV fós igual o inferior al 15%.

Aquest mètode es va validar mitjançant l'ARM (VR-1516, ATCC) i es van establir els criteris d'acceptació indicats a l'annex 1.

3.2.2. Concentració de partícules víriques infeccioses (UI/mL) utilitzant una tinció anti-Ad/*hexon* - Títol funcional

El mètode utilitza l'alta expressió de la proteïna de la càpsida *hexon* en cèl·lules infectades com a estratègia per a detectar i comptabilitzar les cèl·lules infectades, i en última instància, la concentració de partícules víriques funcionals. Per a facilitar el recompte visual del nombre de partícules infeccioses, es va realitzar un banc de dilucions amb l'objectiu de que hi hagués un nombre reduït de partícules virals que poguessin infectar les cèl·lules HEK293. Cada mostra d'Ad5 es va avaluar en una placa de 96 pous amb 6 replicats en un rang de concentracions de $2.0E5$ a $4.1E8$ pv/mL. Cada placa contenia un control de qualitat negatiu (medi DMEM suplementat amb FBS 10% (v/v)) i un control positiu (ARM, VR-1516, ATCC). Es van incubar les plaques a 37°C a un 5% CO₂ durant 40 h. Es van fixar les cèl·lules amb metanol i es va utilitzar el quid comercial *AdEasy Viral Titer Kit* segons les recomanacions de Agilent Technologies com a immunoassaig per detectar les cèl·lules infectades. La reacció colorimètrica amb l'addició del reactiu DAB (Roche) va permetre el recompte de cèl·lules infectades amb l'ús d'un microscopi estàndard (Leica). El recompte de cèl·lules per pou es va realitzar a un mínim de dos nivells de dilució per cada replicat amb un nombre d'entre 20 i 100 cèl·lules. Es va calcular la concentració promig de partícules infeccioses (UI/mL) a cada nivell eliminant un màxim de 2 replicats i es realitza el promig dels diferents nivells de dilució (veure annex 2). El promig entre diferents nivells de dilució havia de complir el CV fós inferior o igual al 20% (veure annex 3). En el cas que de replicats o triplicats de la mostra d'Ad5, es va expressar el resultat com el promig entre plaques. Aquest mètode es va validar mitjançant l'ARM (VR-1516, ATCC) i es van establir els criteris d'acceptació indicats a l'annex 3.

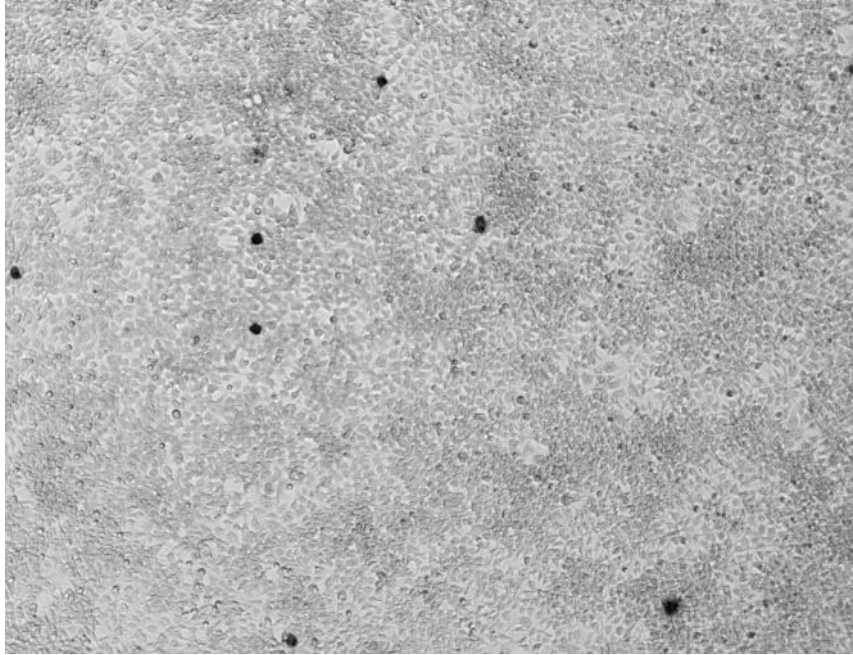


Figura 8. Fotografia de la visualització al microscopi de la determinació de la concentració de partícules víriques infeccioses utilitzant una tinció anti-Ad/hexon amb el quid comercial *AdEasy Viral Titer Kit*. Les cèl·lules de color fosc són aquelles que expressen *hexon* i les que seran comptades per a determinar el nombre d'unitats infeccioses.

3.2.3. Estrès per congelació-descongelació

Es van separar dues al·lquotes de 50 µl de cada estoc víric purificat en un tub de microcentrífuga i es van sotmetre a dos cicles de congelació-descongelació per avaluar l'eficàcia protectora de la formulació enfront a aquest procés. En cada cicle, les al·lquotes van ser congelades a -80°C durant 1h i descongelades a temperatura ambient. Es van aplicar dos cicles per tal de reproduir com a mínim el nombre de congelacions que experimenta un estoc víric en el procés de fabricació d'un lot. Un cop aplicats els dos cicles, es va determinar el títol funcional i es va comparar amb el valor inicial de funcionalitat de l'estoc víric per a determinar l'efectivitat protectora de la formulació en solució.

3.3. LIOFILITZACIÓ

La liofilització es va dur a terme al Centre d'excel·lència en liofilització (CoEL) de Reig Jofré amb l'equip Lyobeta-20 de Telstar (Figura 9). Per una banda, es van fabricar una



centena de lots d'excipients, sense presència d'Ad5. I d'altra banda, en paral·lel als lots d'excipients, es van fabricar lots amb Ad5 per confirmar els paràmetres caracteritzats en els lots d'excipients, i alhora, avaluar l'efectivitat de la formulació liofilitzada no només en termes de qualitat física sinó de protecció i estabilitat.

El primers lots es van dosificar en vials de borosilicat tipus I (Schott), però un cop avaluat l'efecte del material contenidor en la formulació, es van dosificar en vials de borosilicat tipus I plus (Schott). El volum dosificat va ser de 0.5 ml. Es va utilitzar taps de bromobutil tipus I (West Pharma). El programa del cicle va ser dissenyat segons l'anàlisi tèrmic de les formulacions i va variar al llarg del desenvolupament. La recepta de cicle utilitzada en els últims lots fabricats amb la formulació candidata va ser: congelació a -55°C durant 6h, assecat primari a -40°C durant 50h a una pressió de buit de 0.06 mbar i un assecat secundari amb una rampa de 10h fins assolir la temperatura de 30°C i 4h a 30°C (veure annex 4). El lot es va mantenir a 5°C dins la cambra fins que van ser extrets.

3.3.1. Lots d'excipients

La composició de la solució d'excipients va variar amb el desenvolupament del projecte, on els components utilitzats van ser: trehalosa dihidrat (Pfanstiehl), manitol (Pfanstiehl), sacarosa (Merck Millipore), tris (Sigma Aldrich, ara Merck), MgCl₂ hexahidrat (Merck Millipore), NaCl (Merck Millipore), HCl (Sigma Aldrich, ara Merck), glicina (Sigma Aldrich, ara Merck), inulina (Sigma Aldrich, ara Merck), histidina (Merck Millipore), EDTA (Merck Millipore), PS-80 (Croda) i HSA (Grifols). No obstant, la preparativa es va realitzar de la mateixa manera en tots els casos. La solució d'excipients es filtrava amb una unitat de filtració Millex-GV de PVDF (Merck) de 0.22 µm sota campana de flux laminar i es recollia en tubs de centrífuga (Corning) de 50 mL estèril de baixa retenció proteica. En el cas que la solució d'excipients contingués HSA, aquesta s'afegia *a posteriori* de la filtració sota campana de flux laminar. La solució es mantenia en agitació rotacional a 10 rpm durant 15 min a 5°C per assegurar la completa homogeneïtzació.

3.3.2. Lots d'Ad5

Per a estandarditzar els resultats i poder comparar l'efectivitat de les formulacions, el lots es van formular a una concentració de partícules adenovirals equivalent, és a dir, a un títol físic establert. Aquesta concentració va ser inicialment 1E11 pv/mL, però finalment es va definir a 1E12 pv/mL pels requeriments de la dosi. Els estocs vírics es van descongelar a

temperatura ambient. Es van mantenir en agitació rotacional a 10 rpm a 5°C. Un cop homogeneïtzat, es va transferir el volum necessari a un tub de centrífuga (Corning) de 50 mL, on es va addicionar el volum de la solució d'excipients per a obtenir una concentració final de 1×10^{12} pv/mL. El lot es va agitar de nou a 10 rpm durant 10 min a 5°C per garantir l'homogeneïtzació.

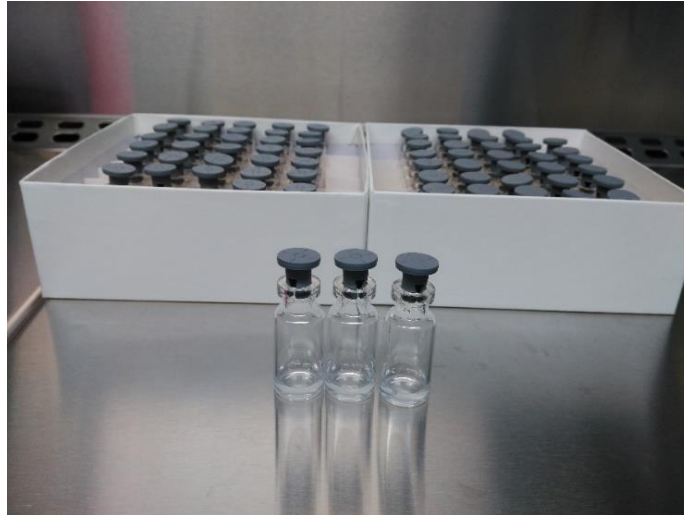


Figura 9. Fotografia d'un lot dosificat amb els vials parcialment tapats per a dur a terme la liofilització.

3.4. CARACTERITZACIÓ TÈRMICA DE LA SOLUCIÓ D'EXCIPIENTS

Per a dissenyar un cicle de liofilització cal caracteritzar tèrmicament la formulació, és a dir, definir els paràmetres tèrmics de T_g' i T_c de la solució d'excipients que componen el lot. Aquest estudi es va dur a terme sempre que la formulació experimentés canvis significatius de composició a nivell quali-quantitatiu.

3.4.1. Calorimetria diferencial d'escombratge (DSC)

El servei es va realitzar pel departament d' Anàlisi Tèrmic del Institut de Química Analítica Avançada de Catalunya (IQAC-CSIC) amb l'equip DSC821 (Mettler Toledo). La velocitat de congelació va ser de 10°C/min amb un rang de temperatura de -80°C a 25°C. Els valors de transició vítria (T_g') es van reportar com el punt mig de la transició observada. Segons



la formulació, es van aplicar un o dos mètodes, segons si s'incorporava o no una etapa d'*annealing*.

3.4.2. Microscòpia de liofilització (FDM)

Aquest anàlisi va ser realitzat pel Centre d'excel·lència en liofilització (CoEL) de Reig Jofré. L'equip utilitzat consistia en un sistema de refrigeració (LNP, Linkam Scientific) i una unitat de control de temperatura (TMS94, Linkam Scientific) en conjugació amb un microscopi òptic (Olympus Life Science Solutions) acoplat a un FDCS196. Es va col·locar una gota de la solució entre dos vidres separats per un espaiador on es va congelar la mostra a velocitat controlada. Es va aplicar el buit i es va subministrar calor de nou. Per registrar l'experiment, una càmera es va connectar a l'equip adquirint imatges del producte congelat durant l'anàlisi.

3.5. ESTUDIS D'ESTABILITAT

3.5.1. Estudis d'estabilitat en solució

Per tal d'avaluar l'efectivitat de la formulació seleccionada en solució es va determinar la concentració de partícules víriques infeccioses en els lots abans de liofilitzar en un o dos vials dosificats. Inicialment, es va emmagatzemar la solució a 5°C, però la infectivitat protectora en solució d'algunes formulacions van fer que es s'estandarditzés l'emmagatzematge a -80°C. A més de la determinació de la concentració de partícules infeccioses a temps 0 en solució, en molts casos, s'ha avaluat la funcionalitat en un rang de temps curt d'entre 6 i 24 h a temperatura ambient per a determinar l'efectivitat protectora de la formulació en solució i establir el temps màxim que el lot pot romandre a l'espera de ser liofilitzat.

3.5.2. Estudis d'estabilitat del liofilitzat a curt i llarg termini

El producte va ser emmagatzemat a les condicions de $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ i $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$, a més de $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\% \text{ RH} \pm 5\% \text{ RH}$ com a condició accelerada simulant el comportament del producte a llarg termini en unes condicions d'emmagatzematge més conservadores.

La majoria d'estudis d'estabilitat es van dur a terme a curt termini entre 1 i 6 mesos per avaluar l'efectivitat d'una formulació i evolucionar la composició de la formulació d'una forma relativament ràpida. Un cop seleccionada la formulació candidata amb el cicle adequat



es van seguir les recomanacions de la FDA Q1A(R2) establint una estabilitat de 6 mesos per a 25°C amb un mínim de 3 punts d'anàlisi que incloguin el principi i el final del període [International Conference on Harmonization, 2003]. En el cas de les condicions d'emmagatzematge reals del producte, en aquest cas 5°C i - 20°C, es va realitzar un estudi de dos anys on el primer any la freqüència d'anàlisi era cada 3 mesos i el segon any cada 6 mesos (veure annex 5 i 6).

3.6. CARACTERITZACIÓ DELS LOTS

El vials liofilitzats d'estudis d'estabilitat a llarg termini són caracteritzats per diversos paràmetres: l'aparença, el temps de reconstitució, el pH, l'agregació per DLS, la concentració de partícules d'adenovirus i la concentració de partícules infeccioses, és a dir, el títol físic i funcional, a més de la humitat residual. La freqüència d'anàlisi, els paràmetres avaluats i el nombre de vials utilitzats per cada anàlisi són definits en el protocol d'estabilitat establert per cada lot (veure annex 5). La disponibilitat de l'estoc víric només ha permès realitzar per duplicat o triplicat els assajos més rellevants: la determinació d'humitat residual i el títol funcional. Indirectament amb aquests vials també s'ha pogut avaluar l'aparença i el temps de reconstitució.

Els lots que han estat objecte d'estudis d'estabilitat de curt termini no s'han caracteritzat de forma completa, només s'han determinat els paràmetres més representatius per avaluar de forma immediata l'efectivitat d'una formulació: l'aparença, la humitat residual, el títol físic i el títol funcional.

D'altra banda, el lots d'excipients, que no contenen Ad5, només han estat sotmesos als procediments analítics físics: l'aparença i la humitat residual.

3.6.1. Aparença

L'aparença es basa en una descripció visual amb llum natural de la pastilla del liofilitzat indicant el color, la textura, si hi ha col·lapse o qualsevol altre atribut que es pugui considerar rellevant per l'històric del producte.



3.6.2. Temps de reconstitució

El temps de reconstitució és el temps necessari per dissoldre la pastilla completament sense deixar residus visibles de material no dissolt. Aquest es va determinar reconstituïnt amb 0.5 ml d'aigua per injecció de Braun i agitant suaument sense generar bombolles. Aquest es va determinar en segons en un mínim de dos vials i el resultat s'ha expressat com el promig del temps de reconstitució.

3.6.3. pH

Es va reconstituïr un vial amb 0.5 ml d'aigua per injecció de Braun i es va mesurar el pH de la solució per mitjà d'una sonda de pH de Hach per micromostres. Aquest es va determinar com a mínim dues vegades i el resultat es va expressar com el promig de les mesures.

3.6.4. Agregació per Dynamic Light Scattering (DLS)

Per a la determinació del nivell de polidispersió i la mida de les partícules d'adenovirus es va utilitzar l'equip de Malvern Zetasizer Nano ZS, model ZEN3600, amb un angle de detecció de la llum dispersada de 173° i un làser vermell de 632 nm a 25°C. Per a tots els anàlisis es va utilitzar un estàndard de nanoesferes de poliestirè de 100 nm (Thermo Scientific). Es van realitzar 5 determinacions per cada 200 µl de mostra en micro-cubetes de poliestirè (Starstedt). Els paràmetres rellevants de l'equip són el diàmetre hidrodinàmic, Z-average, i l'índex de polidispersió (pdi). Els lots en els que pdi ha estat inferior a 0.4, no es va poder determinar el Z-average. El resultat de Z-average i pdi es van expressar com el valor promig de les 5 determinacions.

3.6.5. Humitat residual mitjançant Karl Fischer coulomètric injectat

Es va aplicar un mètode de Karl Fischer coulomètric (veure annex 7). L'equip utilitzar va ser el titrador 852 de Karl Fischer de Mettler Toledo. El mètode es va dissenyar seguint les recomanacions del fabricant on el solvent utilitzat va ser Hydranal Coulomat AG (Honeywell): formamida (Fluka) (70:30 v/v). El resultat d'humitat residual es va expressar com el promig de 2 o 3 vials, segons les determinacions realitzades.

Els càlculs efectuats per obtenir el percentatge d'aigua del vial liofilitzat respecte el pes total de la pastilla (% , m/m) són:



$$\text{Recuperat d'aigua (\%)} = \frac{\mu\text{g } H_2O_{\text{mostra+solvent injectat}} - \mu\text{g } H_2O_{\text{solvent injectat}}}{\mu\text{g } \text{mostra injectada}} \times 100$$

On $\mu\text{g } \text{mostra injectada}$ és:

$$\mu\text{g } \text{mostra injectada} = \frac{P_{\text{mostra+solvent injectat}} \times (P_{\text{vial}} - P_{\text{vial buit}})}{(P_{\text{vial reconstituït}} - P_{\text{vial buit}})} \times 10^6$$

On $\mu\text{g } H_2O_{\text{solvent injectat}}$ és:

$$\mu\text{g } H_2O_{\text{solvent injectat}} = \frac{(P_{\text{mostra+solvent injectat}} \times 10^6) - \mu\text{g } \text{mostra injectada}}{100} \times \text{recuperat blanc (\%)}$$

$P_{\text{mostra+solvent injectat}}$: Pes de mostra i solvent injectat (g)

P_{vial} : Pes del vial ple (g)

$P_{\text{vial buit}}$: Pes del vial buit (g)

$P_{\text{vial reconstituït}}$: Pes del vial reconstituït (g)

$\mu\text{g } H_2O_{\text{mostra+solvent injectat}}$: Contingut total d'aigua (sample + solvent, en μg)

Recuperat blanc (%): Contingut d'aigua del solvent

3.6.6. Concentració de partícules víriques (pv/mL) per espectrofotometria - Títol físic

Mètode descrit a l'a partat 3.2.1. El resultat es va expressar com el promig de 2 o 3 vials, segons les determinacions realitzades.

3.6.7. Concentració de partícules víriques infeccioses (UI/mL) utilitzant una tinció anti-Ad/hexon - Títol funcional

Mètode descrit a l'a partat 3.2.2. El resultat es va expressar com el promig de 2 o 3 vials, segons les determinacions realitzades. A més, es va determinar el percentatge de pèrdua de funcionalitat en les diferents etapes del procés. Aquesta pèrdua va ser expressada com el percentatge de pèrdua en solució, en el procés de liofilització, en el procés de fabricació complet, en estabilitat durant l'emmagatzematge i en el procés global. La pèrdua en solució comparava el títol inicial de l'estoc amb el títol de la solució. La pèrdua en el procés de liofilització es va calcular amb el títol funcional de lot abans de liofilitzar (en solució) i el títol funcional després de la liofilització amb el liofilitzat a temps 0. La pèrdua en el procés de fabricació era la pèrdua completa en solució i en el procés de liofilització i per tant,



comparava el títol inicial de l'estoc amb el títol funcional del liofilitzat a temps 0. La pèrdua en estabilitat era el percentatge de pèrdua de funcionalitat durant l'emmagatzematge i es va avaluar comparant el títol funcional del liofilitzat a temps 0 i el punt d'estabilitat analitzat. En quant a la pèrdua acumulada en el procés global equivalia a la suma de la pèrdua en el procés de fabricació i la pèrdua en estabilitat, i es va calcular a partir del títol inicial de l'estoc i el títol funcional de l'últim temps d'estabilitat analitzat. Exemple de càlcul:

$$\text{Pèrdua en liofilització (\%)} = 100 - \left(\frac{\text{Títol funcional del liofilitzat } t_0 \times 100}{\text{Títol funcional de la solució } t_0} \right)$$

3.7. FRACCIONAMENT PER DENSITAT DELS ESTOCS VÍRICS

Aquest fraccionament va ser realitzat per la Unitat de Producció de virus (UPV) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Els estocs vírics van ser fraccionats en un gradient de CsCl per tal de separar les càpsides completes de possibles proteïnes lliures o altres complexes. En dos tubs d'ultracentrífuga Ultra-Clear de Beckman Coulter es va preparar un gradient discontinu de CsCl 1.40 g/mL i CsCl 1.25 g/mL. Es va centrifuga a 18°C durant 19h a 24600 rpm. Es van recollir les fraccions en volums de 600 µL des de la part superior essent aquesta la fracció 1 fins a un total de 21 fraccions. Es va determinar la densitat de cada fracció mitjançant el seu pes. Aquestes van ser dialitzades mitjançant els cassets Slide-A-Lyzer Dialysis Cassettes, 10K MWCO (Thermo Scientific) a un tampó Tris 25 mM pH 8.4. Es recull cada fracció en un o dos Eppendorfs de 1.5 mL de baixa retenció proteica i es va determina el volum post-diàlisi de cada fracció. Es congelen a -40°C.

3.8. SDS-PAGE

Les fraccions analitzades es van descongelar i mantenir refrigerades fins al seu ús. Es va afegir SDS (Merck) al 10% per assolir una concentració final de SDS al 1% i DTT (Merck) 1M per a una concentració final de 25mM. Es van incubar a 98°C durant 10 minuts. Es van homogeneïtzar i es va carregar un 5% del volum de la mostra. La resta de volum de cada fracció es va congelar a -40°C en dues alíquotes. Al 5% de volum es va afegir NuPage LDS sample buffer 4x (Thermo Scientific) a una concentració final de 1x. Es van utilitzar gels NuPage bis-tris precast amb un gradient de 4-12% d'acrilamida (Thermo Scientific) i un



marcador de pes molecular Precision Plus Protein del rang de 10-250 KD (Bio- Rad). Els gels es van córrer a 30V durant 15 min i després a 200V. Es va realitzar una tinció amb plata amb els protocols estandarditzats del LP-CSIC/UAB.

3.9. DIGESTIÓ FASP (*Filter-aided sample preparation*)

Es va aplicar el mètode estandarditzat del LP-CSIC/UAB on totes les centrifugacions es van realitzar a 14000 rcf a 13°C. Es van utilitzar els filtres Amicon Ultra-0.5 mL 10k (Merck) prèviament rentats amb 400 µL de NaOH (Merck) 0.1 M seguit de 400 µL d'aigua milli-Q, en ambdós casos centrifugat durant 10 min. Es va utilitzar la meitat de cada fracció emmagatzemada a -40°C. Breument, les mostres es van rentar amb 200µL d'urea 8 M en 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 centrifugant 15 min. Es va descartar el recuperat del tub col·lector i es van afegir 100 µL de iodoacetamida 50 mM en urea 8M en 0.1 M Tris-HCl pH 8.5. Es va incubar 20 min a 25°C en foscor a 400 rpm amb un *thermomixer* amb termobloc. Es centrifuga durant 15 min i es van rentar els filtres tres cops amb 100 µL d'urea 8M en 0.1 M Tris-HCl pH 8.5 centrifugant durant 15 min. Es va realitzar un canvi de tampó fent tres rentats amb 100 µL de NH₄HCO₃ 20 mM centrifugant 15 min. Es van afegir 100 µL de NH₄HCO₃ 20 mM amb tripsina (Promega) al 0.1 µg/µL amb una ratio proteica del 3%. Es va incubar a 37°C en foscor durant 18 h agitant a 300 rpm. Els pèptids eluïts de cada fracció es van recollir en un nou tub col·lector afegint tres cops 100 µL de NH₄HCO₃ 20 mM centrifugant durant 2 min a 600 rpm i després durant 15 min a 14000 rcf a 13°C. Es va calcular el volum de cada eluït per la diferència de pes del tub col·lector buit i ple. Els eluïts de cada fracció es van emmagatzemar a -40°C.

3.10. DESSALAT: columnes en puntes C18

Es va realitzar un dessalat de les fraccions digerides per FASP en puntes C18 de 10 µL (PolyLC) segons protocol estàndard del LP-CSIC/UAB. Breument, es van pre-humectar les puntes C18 amb 30 µL d'acetonitril, es va centrifugar a 200xg durant 15 s i a continuació, dos cops amb 30 µL d'acetonitril 60% i àcid fòrmic 0.1% centrifugant a 200xg durant 15 s. Es va equilibrar rentant la punta dos cops amb 30 µL de TFA 0.1% centrifugant a 300xg durant 30 s. Es va carregar la mostra en volums de 100 µL i es va centrifugar a 200xg durant



60 s. Es van realitzar tres rentats amb 30 μL de FA 0.1% centrifugant a 300xg durant 60 s. Un cop descartat el no retingut, es van eluir els pèptids afegint dos cops 25 μL d'una solució d'acetonitril 30% i FA 0.1% centrifugant a 200xg durant 60 s. De nou, dos cops 25 μL d'una solució d'acetonitril 60% i FA 0.1% centrifugant a 200xg durant 60 s. Els eluïts de cada fracció es van emmagatzemar a -40°C .

3.11. STACKING DE PROTEÏNES

Es va preparar gel d'acrilamida de 1.5 mm amb una part inferior de resolució al 10% d'acrilamida i un part superior apil·ladora al 4% d'acrilamida seguint el procediment estàndard de LP-CSIC/UAB. S'utilitza la segona alíquota de cada fracció emmagatzemada a -40°C . Les mostres es van concentrar a un volum d'entre 10-20 μL i es va addicionar glicerol (Sigma Aldrich) al 25% (v/v) i aigua miliQ fins a un volum final de 50 μL . Es va afegir 1 μL de blau de bromofenol a cada mostra. Els 51 μL totals de cada fracció es corren als gels preparats a 65V i 14 mA. L'electroforesi es va aturar quan el front creua el gel apil·lador i concentra el proteoma a l'inici del gel de resolució. Els gels es van emmagatzemen a 4°C en aigua miliQ.

3.12. DIGESTIÓ PROTEICA EN GEL D'ACRILAMIDA

Es va utilitzar el sistema automàtic (DigestPro MS, Instavis) del LP-CSIC/UAB. El procés implica una reducció amb DTT, una derivatització amb IAA i una digestió enzimàtica amb tripsina a 37°C durant 8 h.

3.13. IDENTIFICACIÓ PROTEICA: NANOLC-MS/MS

L'anàlisi LC-MS/MS es va dur a terme com a servei a LP-CSIC/UAB. Es va utilitzar un sistema de HPLC Agilent 1200 (Agilent Technologies) acoplat a un espectròmetre de masses LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific) equipat amb una font de nanoelectrosprai (Thermo Scientific). Les mostres es van evaporar i reconstituir en metanol 5% (v/v) i FA 1% (v/v). Es va injectar en un sistema cromatogràfic equipat amb una columna de preconcentració C18 (300 μm id x 0.5 cm, Agilent Technologies) i una columna analítica (100 μm id x 15

cm, Agilent Technologies). Els pèptids es van eluir directament a la columna analítica amb un flux de 0.4 µL/min utilitzant-se un gradient de 0-35% ACN (FA 0.1%) en 30 min. El sistema cromatogràfic connectat on-line a l'espectròmetre de masses d'alta resolució LTQ-Orbitrap XL (Thermo Scientific) va realitzar l'anàlisi en mode d'escombratges dependents: un escombratge complet utilitzant l'orbitrap amb una resolució de 60000 i 10 escombratges paral·lels de MS/MS en mode CID sobre els 10 ions precursors més abundants. La identificació dels pèptids es va realitzar amb la base de dades Swissprot 2018_01 d'*Adenovirus C serotype 5*.

3.14. MICROSCÒPIA DE TRANSMISSIÓ ELECTRÒNICA (TEM)

Es va dur a terme al Servei de Microscòpia de la Universitat Autònoma de Barcelona amb el microscopi JEM-400 (JEOL USA) equipat amb una càmera ES1000W Erlangshen. Les mostres van ser preparades amb un mètode de tinció negativa. Breument, es van dipositar 8 µl de mostra a una reixeta de coure amb una coberta de carboni i es va deixar assecar a temperatura ambient durant 1 min. L'excés es va retirar amb paper de filtre. Les mostres es van tenyir amb 8 µl d'acetat d'uranil al 2% incubant a temperatura ambient durant 1 min. L'excés es va retirar de nou amb paper de filtre i es va deixar assecar a temperatura ambient 1 min.

4. RESULTATS I DISCUSSIÓ



4.1. GARBELLAT INICIAL DE FORMULACIONS

La selecció d'excipients així com la quantitat i proporció entre ells per a la formulació candidata és la primera fase del desenvolupament. Aquesta selecció es fa en base als criteris desitjats en el producte final. Per tant, és imprescindible definir: (1) la via d'administració del producte, (2) la forma farmacèutica, ja que els factors d'estrès als que s'exposa una formulació liofilitzada difereix dels d'una formulació líquida, (3) la concentració de producte i el volum dosificat, (4) el tipus de vial utilitzat, (5) l'estabilitat mínima necessària a temperatura ambient de la formulació líquida per a tenir una finestra de seguretat en el procés de fabricació, entre altres.

En aquest cas en el que es dissenya una formulació liofilitzada d'Ad5 per a via parenteral implica que el producte ha de ser estèril, lliure d'agent pirògens, en absència d'agregats o amb un mida de partícula ben controlada, on els excipients han d'estar acceptats per la FDA i han de ser d'una puresa elevada. Alhora s'haurà de considerar que aquests excipients siguin compatibles amb el procés de fabricació permetent al producte adquirir una aparença acceptable i reproduïble, i que la reconstitució sigui ràpida i senzilla donant lloc a una solució isotònica o propera a la isotonicitat [Lang & Winter, 2009; Pramanick *et al.*, 2013].

D'altra banda és important definir que és una formulació liofilitzada, ja que els factors d'estrès que introdueix la liofilització són diferents als d'una formulació líquida i la selecció dels excipients han d'estar en consonància a les necessitat marcades pel procés. La formulació caldrà que aporti una protecció suficient en solució d'un mínim d'hores per garantir la robustesa del procés de fabricació i alhora una protecció en estat sòlid que permeti una emmagatzematge a llarg termini.

D'aquesta manera, el primer pas va ser fer una avaluació de les formulacions reportades en la literatura per tal d'identificar les millors opcions per estabilitzar els adenovirus en absència de glicerol. En aquest sentit, es va identificar la formulació líquida A195 del grup investigador d'Evans. (2004) com l'aproximació més estable amb una pèrdua de funcionalitat del 10% després de 2 anys a 4°C (Taula 1). Donat que aquesta compleix alguns criteris del disseny racional d'una formulació proteica liofilitzada (Taula 2), es va proposar un set de formulacions d'excipients amb alguns atributs de la formulació A195 com a proposta de partida. Aquests lots d'excipients van permetre avaluar la possibilitat d'obtenir un liofilitzat amb una determinada formulació, caracteritzar físicament la formulació sòlida,



és a dir, per a determinar l'aspecte, la humitat, la capacitat de dissoldre's i el temps de reconstitució, i/o avaluar la idoneïtat d'una determinada recepta d'un cicle de liofilització. Així doncs, aquests lots sense Ad5 van permetre un garbellat inicial de formulacions per a la posterior avaluació d'efectivitat protectora.

Taula 2. Criteris a seguir per a un disseny racional d'una formulació proteica liofilitzada [Carpenter *et al.*, 2002].

Exemple dels criteris pel disseny racional d'una formulació liofilitzada
El tampó no ha d'acidificar durant la congelació com ara Tris, citrat, histidina, etc.
Addicionar lligands específics i/o adequar el pH per optimitzar termodinàmicament la proteïna.
Utilitzar trehalosa i/o sacarosa per inhibir el desplegament de les proteïnes i proveir d'una matriu vítreia.
Utilitzar un agent de càrrega com ara manitol, glicina, etc.
Utilitzar un surfactant no-iònic per reduir l'agregació proteica.

Inicialment, es van proposar 6 formulacions amb una tampó base 1 equivalent al de A195: Tris - HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 75 mM, MgCl₂ 1 mM, a partir de la qual es modifica la concentració de crioprotector, lioprotector i/o agent de càrrega (Taula 3). A més dels excipients habituals (Taula 2), es va testar la inulina com a excipient crioprotector i lioprotector. Aquest és un sucre poc habitual com a excipient estabilitzador en fàrmacs, ja que sobretot s'utilitza en el camp alimentari. No obstant, alguns estudis proposen el seu ús com excipient estabilitzador de proteïnes plasmàtiques per la seva elevada Tg^{*} respecte altres sucres com la glucosa i la sacarosa, fet que facilita el procés de liofilització [Barclay *et al.*, 2010; Rodríguez *et al.*, 2013].

Les formulacions són liofilitzades amb un cicle de liofilització segons l'anàlisi tèrmic per DSC (Figura 10). Aquest va ser dissenyat per a que fós d'ampli espectre i es poguessin liofilitzar diverses formulacions sota les mateixes condicions de cicle. La recepta del cicle va ser: congelació a -55°C 2 h, *annealing* a -25°C 2 h, congelació a -50°C 2 h, assecat primari a -20°C 15 h i assecat secundari a 5°C 11 h. Es va establir un assecat secundari conservador a 5°C, una temperatura de refrigeració, pel fet que es desconeix la humitat final que pot tenir

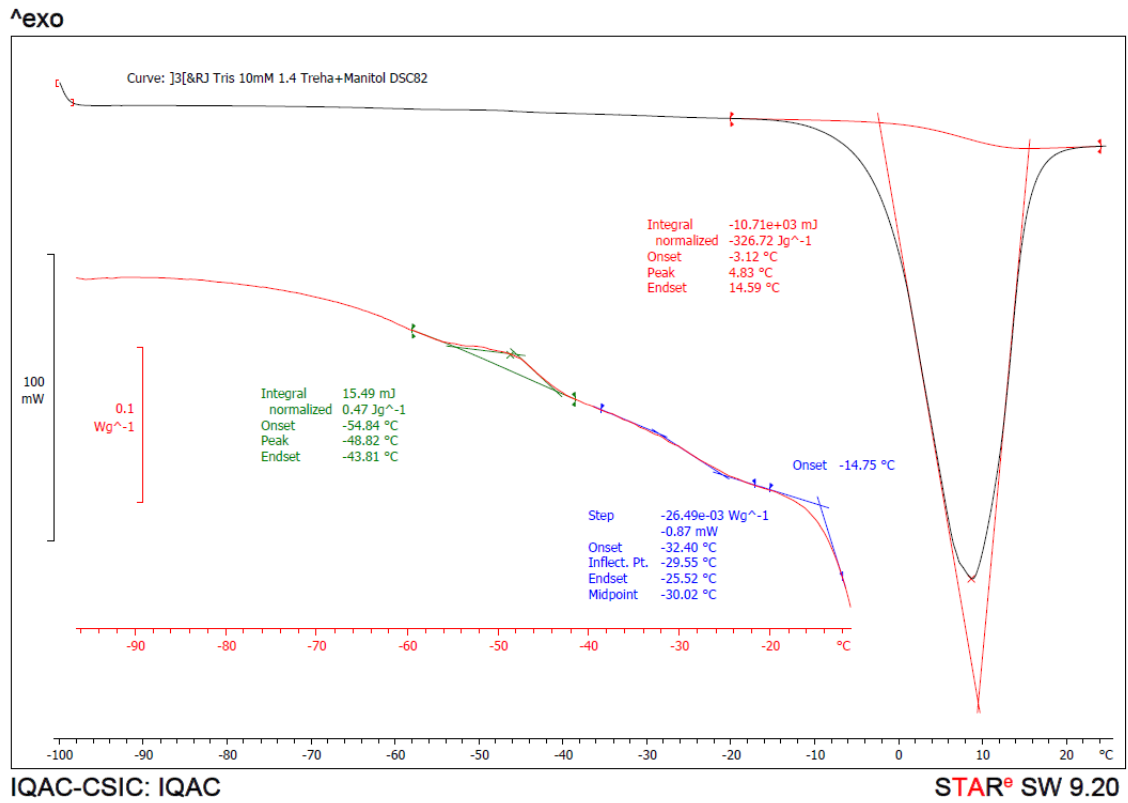
el liofilitzat en aquestes condicions i l'impacte que pot tenir la temperatura sobre l'Ad5 en estat liofilitzat.

Taula 3. Proposta inicial de formulacions d'excipients.

Formulacions	Tampó base 1			
	Composició (% p/v)			
	Trehalosa	Manitol	Inulina	Sacarosa
1	-	-	-	15
2	2.5	-	-	2.5
3	5	-	-	-
4	1	4	-	-
5	-	-	5	-
6	-	5	5	-

Totes les formulacions van presentar un aspecte adequat amb una pastilla blanca, homogènia i uniforme, tret de la formulació 1 (Taula 3) que presentava col·lapse. La pastilla obtinguda era porosa i no homogènia (Figura 11). Aquest fet va fer descartar les formulacions que contenen la sacarosa com a excipient únic, ja que molt probablement el col·lapse macroscòpic observat no favoreixi l'estabilització d'Ad5. A més, l'aspecte de la pastilla suggeria la necessitat d'addicionar un agent de càrrega que conferís una matriu vítreia i millorés l'estructura del liofilitzat.

D'altra banda, es va observar que la formulació 6 presentava un millor aspecte, ja que no presentava un menisc accentuat a la superfície de la pastilla ni una estructura lleugerament encongida com la resta de formulacions. La característica diferencial de la formulació 6 és que aquesta és una formulació binària constituïda per un excipient protector i un agent de càrrega amb un total de sòlids del 10% (p/v). En canvi, les altres propostes presenten un màxim dun 5% (p/v) de sòlids.



IQAC-CSIC: IQAC

Figura 10. Anàlisi tèrmic per DSC de la formulació 4.

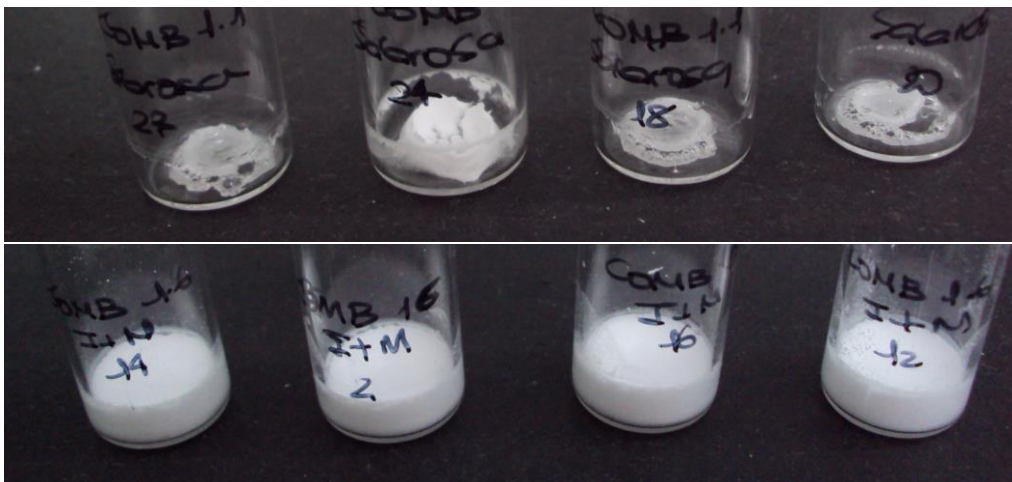


Figura 11. Lot liofilitzat amb la formulació 1 amb un col·lapse macroscòpic (amunt) i lot liofilitzat amb la formulació 6 amb una pastilla uniforme i homogènia (avall).



Tenint en compte aquests resultats, es va proposar un nou set de formulacions d'excipients amb un 10% (p/v) en sòlids per tal de comprovar l'aspecte del liofilitzat, la solubilitat i la humitat residual (Taula 4 i 5). Aquestes van ser liofilitzades amb la mateixa recepta de cicle anterior: congelació a -55°C 2 h, *annealing* a -25°C 2 h, congelació a -50°C 2 h, assecat primari a -20°C 15 h i assecat secundari a 5°C 11h.

Taula 4. Formulacions d'excipients amb un 10% (p/v) de sòlids.

Formulacions	Tampó base 1			
	Composició (% p/v)			
	Trehalosa	Manitol	Inulina	Sacarosa
7	10	-	-	-
8	7	3	-	-
9	7	2	1	-
10	9	-	1	-
11	7	1	2	-

Taula 5. Caracterització de les formulacions proposades a un 10% (p/v) de sòlids

Formulacions	Característiques		
	Aspecte	Solubilitat	Humitat (%)
7	Pastilla blanca i uniforme	Bona	3.2
8	Pastilla blanca amb un menisc superficial accentuat	Bona	3.0
9	Pastilla blanca i uniforme	Bona	3.6
10	Pastilla blanca i uniforme	Bona	3.5
11	Pastilla blanca i uniforme	Incorrecta	2.8

*Solubilitat bona: temps de reconstitució inferior a 60 s.

Les 5 formulacions proposades amb un 10% (p/v) de sòlids van liofilitzar correctament donant lloc a una pastilla adequada. Tret de la formulació 11, totes les formulacions

liofilitzades eren solubles amb un temps de reconstitució inferior a 60 s. Les humitats residuals van ser molt similars amb valors entre 3-3.5%. La humitat residual ve determinada per la temperatura i el temps d'assecat secundari. Tenint en compte que aquest cicle ja tenia una durada de 11 h, un augment de temps a la mateixa temperatura de 5°C no permetria assolir una humitat molt més baixa. Per tant, era necessària una força tèrmica superior per a eliminar major aigua residual.

Considerant la caracterització física realitzada, les formulacions 7, 9 i 10 eren les formulacions més idònies entre les proposades per testar l'efectivitat protectora en Ad5.

4.2. AVALUACIÓ DE L'EFICÀCIA PROTECTORA DE LES FORMULACIONS SELECCIONADES

En paral·lel als lots d'excipients, es van fabricar lots d'Ad5 per corroborar els paràmetres prèviament caracteritzats en els lots d'excipients i avaluar l'efectivitat protectora. Aquestes dues línies de recerca simultànies van ser complementàries en tot el desenvolupament i van permetre accelerar el procés de garbellat, selecció i optimització.

Es van fabricar tres lots d'Ad5 amb la composició de les formulacions 7, 9 i 10 per conèixer el nivell de protecció oferit per aquestes. Aquests van ser LP0243_20 (formulació 7), LP0243_21 (la formulació 9) i lot LP0243_22 (formulació 10). Es va avaluar la protecció oferida en solució a 5°C (5 h), en el procés de fabricació i en l'emmagatzematge amb un estudi d'estabilitat de 3 mesos a 5°C i -20°C. Es van definir aquestes temperatures considerant que l'objectiu era assolir una formulació estable a temperatures inferiors a -80°C. Donat que no es coneixia l'estabilitat de l'Ad5 en les condicions establertes, es van definir una temperatura de congelació més conservadora a -20°C i una temperatura de refrigeració a 5°C que idealment pogués facilitar el transport i l'administració a llocs remots.

Per a poder comparar lots d'un mateix cicle de liofilització o diferent i tenir dades fiables, va ser necessari estandarditzar la concentració vírica de cada lot a 1E11 pv/mL. Els tres lots es van preparar a partir d'un mateix estoc víric amb un títol funcional normalitzat de 6.60E9 UI/ml. Es van liofilitzar amb el mateix cicle de liofilització que els lots d'excipients.



Taula 6. Títol funcional (UI/mL) dels lots LP0243_20, LP0243_21 i LP0243_22 i la pèrdua de funcionalitat en estabilitat (%) al punt d'estabilitat de 3 mesos a 5°C i -20°C.

Lot	Solució a 5°C	Temps d'estabilitat liofilitzat (mesos)				Pèrdua en estabilitat (%)
		t ₀	Condicció	2	3	
LP0243_20	2.97E7	8.40E8	5°C	7.93E7	4.07E7	95
			-20°C	3.70E8	3.80E8	55
LP0243_21	4.62E7	1.21E9	5°C	8.73E8	8.50E8	30
			-20°C	8.13E8	1.04E9	14
LP0243_22	6.50E7	1.03E9	5°C	3.80E8	3.00E8	71
			-20°C	5.90E8	4.10E8	60

Tots tres lots van experimentar pèrdues de funcionalitat en solució a 5°C d'aproximadament 2 ordres de magnitud de valors de 1E9 UI/mL a 1E7 UI/mL (Taula 6). Els lots en solució es van analitzar el mateix dia de la fabricació i es van mantenir a 5°C fins al moment d'anàlisi. Aquesta pèrdua significa que els lots no eren estables en solució a 5°C i que per tant, la seva composició no protegia enfront als mecanismes d'estrès propis de la formulació líquida.

Si aquesta pèrdua de funcionalitat en la solució a 5°C hagués estat causada per l'estrès propi del procés de congelació, també s'observaria en el liofilitzat a temps 0, ja que la liofilització presenta una primera etapa de congelació. En canvi, els valors de funcionalitat del liofilitzat estan per sobre dels de la solució en els tres lots. Aquest fet va plantejar la millora de la crioprotecció per a conferir una major estabilitat per al cicle de congelació-descongelació que experimentava l'alíquota en solució abans del seu anàlisi. A més, aquest comportament no va permetre tenir un valor real de títol funcional del lot en solució abans de liofilitzar. I per tant, no es va poder utilitzar com a valor inicial per a calcular la pèrdua de funcionalitat en el procés de liofilització. Per aquest motiu, es va establir emmagatzemar les alíquotes del lot en solució a -80°C, essent la temperatura d'emmagatzematge més conservadora.

Per a l'escalat industrial és necessari disposar d'un temps raonable entre la solució i el liofilitzat per tal de tenir un marge de temps entre les diferents operacions i disposar d'un procés de fabricació robust. Així doncs, les formulacions proposades no permeten la finestra de temps requerida i no són adequades per a l'escalat.



Malgrat que no es va poder avaluar quina de les tres formulacions era més protectora enfront al procés de liofilització, si va ser possible avaluar la pèrdua de funcionalitat en el procés complet de fabricació i en estabilitat. El lot LP0243_21 és el que va tenir un títol de partida al liofilitzat a temps 0 superior i presentava una pèrdua de funcionalitat més baixa tant a 5°C com a -20°C. Així doncs, tot i no ser un bon candidat per a l'estabilització de l'Ad5, la formulació 9 és un subòptim, susceptible de ser optimitzat i millorar la seva estabilitat en solució així com en liofilitzat.

4.3. SUBSTITUCIÓ DE LA INULINA PER LA SACAROSA I ADDICIÓ D'ALBÚMINA

Durant el desenvolupament d'aquest estudi, la inulina va deixar de sintetitzar-se amb el grau de puresa i qualitat parenteral, de manera que es va decidir substituir-la per un altre crioprotector comú, la sacarosa.

Es van fabricar tres lots amb una composició quantitativa equivalent i es va dur a terme un estudi d'estabilitat a curt termini de 2 mesos a 5°C i 6 mesos a -20°C. El lot LP0243_23 amb la composició de la formulació 9 per tal de tenir la referència de la formulació que es va identificar com a subòptim. El lot LP0243_24 substituint la inulina per sacarosa. I per últim, el lot LP0243_25 que incorpora el surfactant i els antioxidants de la formulació A195: 0.02% (p/v) PS-80, histidina 10 mM i EDTA 100 µM (Taula 7).

Els tres lots es van preparar a partir d'un mateix estoc víric amb un títol funcional normalitzat de 1.07E9 pv/ml i es van fabricar a una mateixa concentració diana de 1E11 pv/mL. La recepta del cicle va ser: congelació a -55°C 2 h, *annealing* a -25°C 2 h, congelació a -50°C 2 h, assecat primari a -20°C 18 h i assecat secundari a 5°C 11 h i a 10°C 5 h. Es va augmentar el temps d'assecat primari per a garantir que aquest finalitzava correctament. A més, es va afegir una subetapa a l'assecat secundari a 10°C per avaluar si el fet d'augmentar 5°C permet reduir la humitat residual del liofilitzat.

En primer lloc, es pot observar que les pèrdues en solució a -80°C van ser inferiors a les observades amb els lots anteriors (Taules 8 i 9) i no arriben a ser d'un ordre de magnitud en cap dels lots, ja que el valor diana és 1.07E9 UI/mL i les solucions analitzades tenen un valor entre 3-5E8 UI/mL. Així doncs, les formulacions proposades estabilitzen l'Ad5 millor a -



80°C que a 5°C. No obstant, com es pot veure en el lot LP0243_24, el liofilitzat a temps 0 presentava una major funcionalitat que la solució prèvia a liofilitzar. Aquest fet posa de nou en manifest que estem treballant amb formulacions que no són estables en solució, ja que inclús a -80°C perden funcionalitat. De manera que era necessari estudiar de forma exhaustiva l'estabilitat en solució de les formulacions liofilitzades per tal de garantir un valor inicial fiable del lot en solució, i poder determinar la pèrdua de funcionalitat en el procés de liofilització.

Taula 7. Composició dels lots LP0243_23, LP0243_24 i LP0243_25.

Lots	Tampó base 1				
	Composició (% p/v)				Presència de surfactant i antioxidants
	Trehalosa	Manitol	Inulina	Sacarosa	
LP0243_23	7	2	1	-	-
LP0243_24	7	2	-	1	-
LP0243_25	7	2	-	1	X

Taula 8. Títol funcional (UI/mL) dels lots LP0243_23, LP0243_24 i LP0243_25 i la pèrdua en l'estudi d'estabilitat de 2 mesos a 5°C i 6 mesos a -20°C.

Lot	Solució a -80°C	Temps d'estabilitat liofilitzat (mesos)				Pèrdua en estabilitat (%)
		t ₀	Condició	2	6	
LP0243_23	3.62E8	1.56E8	5°C	7.20E7	-	54
			-20°C	1.82E8	1.33E8	15
LP0243_24	3.56E8	7.86E8	5°C	1.63E7	-	98
			-20°C	8.93E7	4.44E7	94
LP0243_25	4.86E8	1.57E8	5°C	3.49E7	-	88
			-20°C	1.47E8	1.23E8	22

Taula 9. Pèrdua de funcionalitat (%) dels lots LP0243_23, LP0243_24 i LP0243_25 en solució, en el procés de fabricació i en estabilitat a -20°C tenint en compte que l'estoc té un títol funcional normalitzat de 1.07E9 UI/mL.

Lots	Pèrdua de funcionalitat (%)		
	Solució	Fabricació	Estabilitat 6 mesos, -20°C
LP0243_23	66	85	15
LP0243_24	67	27	94
LP0243_25	55	85	22

A nivell de pèrdua de funcionalitat en estabilitat, la proposta de formulació amb inulina del lot LP0243_23 va seguir essent la formulació més estable i per tant, la substitució d'inulina per sacarosa no va conferir la protecció desitjada. En canvi, l'addició de PS-80, histidina i EDTA al lot LP0243_25 va permetre obtenir nivells de protecció en estabilitat a -20°C similars al lot LP0243_23. No obstant, la formulació del lot LP0243_24 va ser la formulació més resistent al procés de fabricació, ja que respecte el títol inicial de l'estoc perd un 27% de funcionalitat enfront a un 85% dels altres lots.

D'altra banda, es va observar que un assecat secundari a 10°C no redueix la humitat assolida a 5°C com a mínim a 5 h d'exposició, de manera que cal incrementar el temps a 10°C o incrementar la temperatura si es desitja reduir la humitat residual final (Taula 10). Donat que és necessari un canvi de temperatura superior a 5-10°C per tenir un canvi significatiu en la humitat final del producte i en l'escurçament de la durada de l'assecat primari, es va decidir dur a terme un assecat secundari a 30°C per avaluar l'impacte a nivell d'humitat i funcionalitat.

Taula 10. Humitat residual (%) dels lots LP0243_23, LP0243_24 i LP0243_25

Lot	Humitat (%)
LP0243_23	3.6
LP0243_24	3.4
LP0243_25	3.8



En aquest punt, es va plantejar l'addició d'albumina com a excipient estabilitzador amb l'objectiu d'assolir l'estabilitat en solució que cap de les formulacions havia permès i l'estabilitat del liofilitzat a nivells com a mínim equivalents a LP0243_23 (Taula 9). L'albumina és una proteïna sèrica que actua com a transportador en sang, ja que s'uneix a proteïnes, àcids grassos, fàrmacs, etc. Aquesta unió pot ser aprofitada per estabilitzar proteïnes actuant com a crioprotector i lioprotector. A més, és una proteïna amb propietats amfifíliques que la fan adequada com a additiu per inhibir l'adsorció del component actiu a la paret del vial competint amb els mecanismes d'adsorció. Alhora, aquesta té una Tg' alta que favoreix la liofilització i una superfície activa que la fa adequada com a surfactant per a prevenir l'agregació proteica [Tarelli *et al.*, 1998]. D'altra banda, el fet que l'Ad5 s'uneixi a albumina humana abans de ser injectat en sang, pot ser una avantatge de cara a emmascarar el virus del sistema immunitari i millorar la potència *in vivo* del vector. Tenint en compte aquestes avantatges, l'albumina va ser un bon candidat per a testar la seva eficàcia protectora. Inicialment, es va afegir una concentració baixa de 0.04% per tal d'examinar si la seva addició aportava una millora a la formulació.

Donat que la protecció oferida en liofilització i en l'emmagatzematge ve donada per formulacions diferents, era necessari millorar el disseny de la formulació per permetre estabilitzar en ambdós casos. Es va voler abordar en un mateix assaig tres qüestions: (1) si la incorporació d'albumina afavoria l'estabilització de l'Ad5 tant en solució com liofilitzat, (2) com d'estables eren en solució les formulacions alternatives a la inulina amb i sense albumina a temperatura ambient i (3) si un assecat secundari a 30°C és viable per l'estabilitat d'Ad5 i no causa una pèrdua de funcionalitat superior a la de 10°C. Es fabricaren 4 lots en els que s'estudia l'estabilitat en solució fins a 24 h a temperatura ambient a partir d'un mateix estoc amb un títol funcional normalitzat de 1.24E9 UI/mL (Taula 11).

Dels 4 lots fabricats, el lot LP0243_26 presentava una clara avantatge protectora. Aquest lot no va experimentar pèrdues fins les 5 h a temperatura ambient i després de 24 h únicament perd un 18%. En canvi, la resta de lots van experimentar una pèrdua de pràcticament el 100% de funcionalitat (Taula 12). Així doncs, la formulació del lot LP0243_26 feia viable un escalat industrial. I alhora, evitava la pèrdua de funcionalitat de l'Ad5 emmagatzemat a -80°C a curt termini. Aquest fet va fer possible estabilitzar el lot en solució abans de liofilitzar i tenir un valor de referència per a poder determinar la pèrdua de funcionalitat en el procés de liofilització. I a més, va fer possible tenir un estoc víric estable a curt termini a -80°C



Taula 11. Composició dels lots LP0243_26, LP0243_27, LP0243_28 i LP0243_29.

Lots	Tampó base 1						
	Composició						
	Trehalosa (% p/v)	Manitol (% p/v)	Sacarosa (% p/v)	PS-80 (% p/v)	Histidina (mM)	EDTA (μ M)	Albúmina (% p/v)
LP0243_26	7	2	1	-	-	-	0.04
LP0243_27	7	2	1	0.02	10	100	0.04
LP0243_28	7	2	1	-	-	-	-
LP0243_29	7	2	1	0.02	10	100	-

Taula 12. Títol funcional (UI/mL) dels lots en solució: LP0243_26, LP0243_27, LP0243_28 i LP0243_29 a temps 0 i exposats a temperatura ambient fins a 24 h, a més de la pèrdua de funcionalitat (%) respecte la solució t_0 .

Lots	Temps d'exposició (h)						Pèrdua (%)
	t_0	1	2	3	5	24	
LP0243_26	1.03E9	1.05E9	1.08E9	1.13E9	1.23E9	8.5E8	18
LP0243_27	8.80E8	8.60E8	8.85E8	8.93E8	8.95E8	1.55E6	100
LP0243_28	7.90E8	6.95E8	6.85E8	7.15E8	8.05E8	2.55E5	100
LP0243_29	7.65E8	7.63E8	8.03E8	8.05E8	8.02E8	3.55E5	100

Els lots LP0243_26 i LP0243_27 van ser liofilitzats amb l'objectiu d'identificar si alguna de les formulacions permetia preservar la funcionalitat a un nivell similar o superior a la formulació 9 amb inulina. Aquests van ser liofilitzats amb la recepta següent: congelació a -55°C 2 h, *annealing* a -25°C 2 h, congelació a -50°C 2 h, assecat primari a -20°C 18 h i assecat secundari a 10°C 7 h i a 30°C 4 h. S'extreuen vials després de l'assecat a 10°C (extracció 1) i al final de cicle després de l'assecat a 30°C (extracció 2) per avaluar l'impacte de la temperatura a nivell d'humitat i funcionalitat.



Taula 13. Títol funcional (UI/mL) dels lots LP0243_26 i LP0243_27 a temps 0 amb les dues extraccions: extracció 1 (10°C 7 h) i extracció 2 (10°C 7 h i 30°C 4 h).

Lots	Solució t ₀	Liofilitzat t ₀	
		Extracció 1	Extracció 2
LP0243_26	1.03E9	2.83E8	2.46E8
LP0243_27	8.80E8	3.00E8	2.61E8

Taula 14. Pèrdua de funcionalitat (%) dels lots LP0243_26 i LP0243_27 en solució, en la liofilització i en el procés complet de fabricació partint d'un estoc a 1.24E9 pv/mL.

Lots	Pèrdua de funcionalitat (%)				
	Solució	Liofilització		Fabricació	
		Extracció 1	Extracció 2	Extracció 1	Extracció 2
LP0243_26	17	73	76	77	80
LP0243_27	29	66	70	76	79

La pèrdua en solució del lot LP0243_26 va ser pràcticament la meitat que en el lot LP0243_27, amb un 17 i 29%, respectivament. Així doncs, la crioprotecció oferida per la formulació va ser millor en el lot LP0243_26. Tanmateix, no hi ha una millora de la pèrdua en fabricació, de manera que l'albumina no és suficient per assolir la crioprotecció i lioprotecció necessària com a mínim a la concentració de 0.04 % (p/v). A més, no hi ha diferències en la pèrdua en liofilització entre lots, de manera que a nivell de lioprotecció no hi ha una avantatge diferencial i cap de les dues formulacions confereix la protecció global necessària (Taules 13 i 14).

D'altra banda, la pèrdua en liofilització entre extraccions és pràcticament equivalent, fet que permet introduir un cicle amb un assecat secundari a 30°C si és necessari assolir una humitat residual per sota de l'obtinguda prèviament d'aproximadament 3% (Taula 14).

4.4. ESTUDI DE BIOCMPATIBILITAT DE L'ENVÀS PRIMARI

Donat que un dels atributs crítics de les solucions d'Ad5 és l'adsorció a superfícies, es va avaluar la compatibilitat amb les superfícies amb les que l'Ad5 contacta durant el procés de fabricació. Així doncs, es van estudiar les superfícies de plàstic d'un tub Eppendorf de 1.5



mL i un tub de centrífuga de 15 mL estèrils i de baixa retenció proteica per tal de garantir que no hi ha una pèrdua en el procés de fabricació associada a l'ús d'aquest material. I a més, es va avaluar la superfície de vidre del vial, ja que és l'envàs primari del producte. Es va comparar el borosilicat tipus I amb el tipus I plus per avaluar si hi ha una avantatge en l'ús del borosilicat tipus I plus en relació a l'adsorció de l'Ad5 a la superfície.

Es va fabricar el lot en solució LP0243_36 amb la composició del lot LP0243_24, essent aquest la base de la formulació que s'està dissenyant: Tris - HCl 10 mM pH 7.4 , NaCl 75 mM, MgCl₂ 1 mM, 7% (p/v) trehalosa, 2% (p/v) manitol i 1% (p/v) sacarosa. Es va mantenir el lot a temperatura ambient en els 4 envasos proposats i es va congelar a -80°C cada alíquota a temps 0, 8 h, 12 h i 24 h d'exposició a temperatura ambient. Es va avaluar el títol físic a cada temps tenint en compte el vaor inicial de 1E11 pv/mL. Com era el mateix lot exposat a 4 superfícies diferents, una disminució del títol físic no seria deguda a la ineficàcia protectora de la formulació, sinó a la interacció de la superfície amb l'Ad5, i per tant, a l'adsorció.

Així doncs, el material plàstic utilitzat en la fabricació a escala laboratori no adsorveix l'Ad5, ja que no va haver una disminució del títol físic inicial. En canvi, el vial de vidre tipus I va experimentar una reducció del 37%, percentatge superior al CV de la precisió del mètode (veure annex 1). De manera que va ser convenient utilitzar el vial tipus I plus que no adsorveix l'Ad5 (veure Taula 18).

Taula 15. Títol físic (vp/mL) del lot LP0243_36 a temperatura ambient a temps 0, 8 h, 12 h i 24 h, i la pèrdua de títol físic (%) a les 24 h d'estabilitat.

Tipus d'envàs	Temps d'exposició (h)				Pèrdua de partícules (%)
	0	8	12	24	
Eppendorf	9.3E10	8.7E10	8.9E10	9.1E10	3
Tub centrífuga	9.2E10	9.0E10	8.9E10	9.0E10	3
Vial tipus I	9.0E10	8.8E10	8.5E10	5.7E10	37
Vial tipus I plus	8.6E10	8.7E10	9.0E10	9.1E10	0

4.5. CANVI DE CONCENTRACIÓ VÍRICA AL LOT DE 1E11 pv/mL a 1E12 pv/mL

Degut a la limitació de material disponible d'estoc, inicialment es va establir una concentració estàndar en els lots de 1E11 pv/mL. Un cop s'ha diposat de volums superiors i s'ha identificat una formulació subòptim candidata per ser optimitzada, ja es va poder treballar a la concentració final del producte de 1×10^{12} pv/mL. Tenint en compte que es va augmentar 10 vegades la concentració d'Ad5, es va decidir mantenir la mateixa ratio virus-albúmina proposada al lot LP0243_26. De manera que es va addicionar l'albúmina al 0.4% (p/v), 10 vegades més que la concentració inicial.

Taula 16. Títol funcional (UI/mL) del lot LP0243_44 i la pèrdua de funcionalitat en solució (%) i en liofilització(%) a partir del títol inicial de l'estoc de 4.37×10^{10} UI/mL.

Lot	Solució	Liofilitzat t_0	Pèrdua en solució (%)	Pèrdua en liofilització (%)
LP0243_44	2.73E8	3.37E8	99	0

Es va preparar el lot LP0243_44 a partir d'un estoc amb títol funcional normalitzat de 4.37×10^{10} UI/mL. Al determinar el títol funcional, de nou es va observar el fenomen en que la solució presenta un títol inferior que el liofilitzat, a més d'una pèrdua de pràcticament el 100% en solució (Taula 16). Tenint en compte que es va augmentar la concentració de proteïna present i que això beneficia l'estabilització del virus [Altaras *et al.*, 2005], es va sospitar de la presència d'algun atribut de la formulació que estigués interferint en l'estabilització de l'Ad5. L'atribut comú en totes les formulacions és el pH, el qual no va ser empíricament avaluat i va ser fixat seguint la referència de la formulació A195 [Evans *et al.*, 2004]. Aquest fet va fer pensar en el pH com atribut crític, ja que va ser fixat a 7.4 sense avaluar la seva idoneïtat en les formulacions proposades.



4.6. ESTUDI DE L'IMPACTE DE pH EN L'ESTABILITAT DE L'AD5

A més de les variacions de la funcionalitat dels lots anteriorment fabricats, també es va detectar una inestabilitat en els estocs vírics d'Ad5 purificats, ja que perdien funcionalitat d'una forma relativament ràpida i no homogènia. Inicialment, amb els resultats de l'estoc A es va pensar que la formulació protegia l'Ad5 congelat com a mínim a 6 mesos a -80°C . No obstant, els resultats dels estocs B i C van mostrar una clara pèrdua de funcionalitat en els estocs (Taula 17).

Taula 17. Títol funcional (UI/mL) dels estocs A, B i C a temps 0, 1 mes i 6 mesos a -80°C .

Mostra	Títol funcional (IU/ml)			CV(%) a 6mesos
	t_0	1 mes	6 mesos	
Estoc A	4.13E10	4.90E10	3.79E10	14
Estoc B	1.31E11	9.45E10	2.18E9	171
Estoc C	4.80E10	3.23E10	1.54E8	166

Aquesta pèrdua de funcionalitat no observada en el estoc A d'Ad5 purificats va dur-nos a estudiar els possibles canvis que hi podia haver entre els estocs. Tots tres estocs havien estat purificats en la mateixa solució d'excipients en quant a composició, però diferien en pH. L'estoc A es va purificar en Tris 10 mM, NaCl 75 mM, MgCl_2 1mM i 5% (p/v) de trehalosa, mentre que l'estoc B i C en Tris - HCl 10 mM pH 7.4, NaCl 75 mM, MgCl_2 1mM i 5% (p/v) de trehalosa. Així doncs, a l'estoc A no es va ajustar el pH amb HCl i tenia un pH final de 8.9, a diferència dels estocs B i C amb un pH 7.4. Tenint en compte les diferències entre les alíquotes analitzades a 6 mesos dels estocs C i D, es va plantejar que el pH 7.4 podia ser un promotor de l'agregació en les formulacions proposades. L'agregació és un procés



desorganitzat que no actua sota un patró uniforme, fet que explicaria la variabilitat entre alíquotes.

Així doncs, es va analitzar l'evolució de l'agregació a temperatura ambient durant 2 h de l'estoc A i l'estoc B, com a exemple de pH 7.4 (Taula 18). Es van mirar les diferències a nivell de Z-average, el diàmetre hidrodinàmic resultant del promig de la distribució de mides, i el pdi que defineix l'amplada d'aquesta distribució i per tant, el grau de polidispersió. A temps 0 ja es van observar diferències entre els estocs. L'estoc A presentava una mida de partícula de 120 nm amb un pdi de 0.12, i per tant, amb un pdi baix que mostra una població de partícules majoritària i uniforme. A més, la mida de partícula és equivalent a la descrita a la literatura on el diàmetre hidrodinàmic de l'Ad5 és de 117 ± 6 nm a 25°C [Rexroad *et al.*, 2002]. En canvi, l'estoc B presentava una polidispersió alta que s'explicaria per un nivell d'agregació alt i la presència de partícules grans. En aquest cas el Z-average no pot considerar-se correcte degut a la baixa homogeneïtat de la mostra.

Taula 18. Resultats de l'evolució de Z-average i pdi a temperatura ambient a 2 h de l'estoc

Temps (h)	Estoc A		Estoc B	
	Z-average (nm)	pdi	Z-average (nm)	pdi
t_0	120	0.12	1065	0.87
1	113	0.05	1091	0.91
2	115	0.05	2379	0.54

Després de 2 h a temperatura ambient, l'estoc A es va mantenir constant i no es va observar un augment del nivell d'agregació, mentre que l'estoc B va experimentar canvis a nivell de polidispersió. Probablement, l'estat d'agregació va anar canviant al llarg de les 2 h a temperatura ambient. Aleshores, el pH afecta a l'estabilitat de l'Ad5 a nivell d'agregació, el que es tradueix en una pèrdua de funcionalitat, ja sigui per la dificultat d'entrar a la cèl·lula per raons estèriques o per la pèrdua de *fiber*, la proteïna mitjançant la qual s'estableix el primer contacte.

4.6.1. Estudi de l'impacte del rang de pH òptim per Ad5

Es van utilitzar els estocs A i B per a avaluar l'efecte del pH en l'agregació de l'Ad5 en el rang de pH òptim per les formulacions protectores d'adenovirus, 7.4 - 9 [Sene, 1998; Evans *et al.*, 2008]. L'estoc víric A es va acidificar a un pH de 8.7, 8.4 fins a un pH final de 7.6. I



d'altra banda, l'estoc víric B es va alcalinitzar fins a un pH final de 8.9. L'acidificació ens va permetre avaluar l'impacte del pH en el rang baix i la basificació l'impacte de pH en el rang alt, a més de la possible reversibilitat parcial de l'agregació induïda.

L'estoc A al ser acidificat va incrementar la mida de partícula substancialment. De manera que el fet disminuir el pH de la solució va en detriment de l'estabilitat física de l'Ad5, ja que es promou una agregació i una conseqüent disminució de funcionalitat.

Taula 19. Resultats de l'evolució de Z-average i pdi a diferents pH de l'estoc A i B.

Estoc A		
pH	Z-average (nm)	pdi
8.7	118	0.13
8.4	2800	0.22
7.6	4778	0.23
Estoc B		
pH	Z-average (nm)	pdi
7.3	2011	0.42
8.9	800	0.69

En el cas de l'estoc B, la basificació de la solució fins a un pH 8.9 va provocar una disminució de la mida de partícula (Taula 19). Aquesta mida no pot ser considerada com un valor fiable degut a l'alta polidispersió de la mostra. No obstant, indica que hi ha una alteració del sistema on la tendència a l'agregació sembla que s'atura o com a mínim, disminueix (Figura 12).

Per tal d'analitzar en profunditat l'efecte d'un pH superior a 7.4 en l'estabilitat d'un estoc d'Ad5 es van realitzar tres bescavis de la solució de l'estoc B (Taula 20). Els tres bescanvis de la solució de l'estoc B van ser: (B1) a una solució amb un tampó amb la composició Tris 10 mM- HCl pH 8.0, (B2) i (B3) es van realitzar a una solució amb un tampó amb la composició Tris 25 mM - Glicina 0.192 M pH 8.5. Es va proposar utilitzar un tampó diferent al Tris-HCl per diverses raons. En primer lloc, per millorar la capacitat tamponadora. Es va augmentar la concentració de Tris i alhora s'afegeix una concentració elevada de glicina. A més, aquest tampó augmenta la viscositat de la formulació. Durant la congelació es poden generar microambients on augmenti la concentració de H⁺ i disminueixi el pH. Un augment de la viscositat, contribuirà a una menor reactivitat dels components i a una millor protecció

durant la congelació. I per últim, l'us de glicina com a part del tampó aporta càrrega de sòlids que podria ser beneficiós per a l'estructura de liofilitzat. Així doncs, potencialment era un tampó que podia desempenyar una funció doble tamponant la solució i conferint una millor estructura al liofilitzat. Aquests estocs resultants es van anomenar B1, B2 i B3, respectivament, i van ser analitzats a temps 0, 1 h i 2 h. Al modificar el pH inicial de 7.4 a un pH de 8.5 també es podria veure la reversibilitat de l'agregació induïda pel pH si aquesta fós possible.

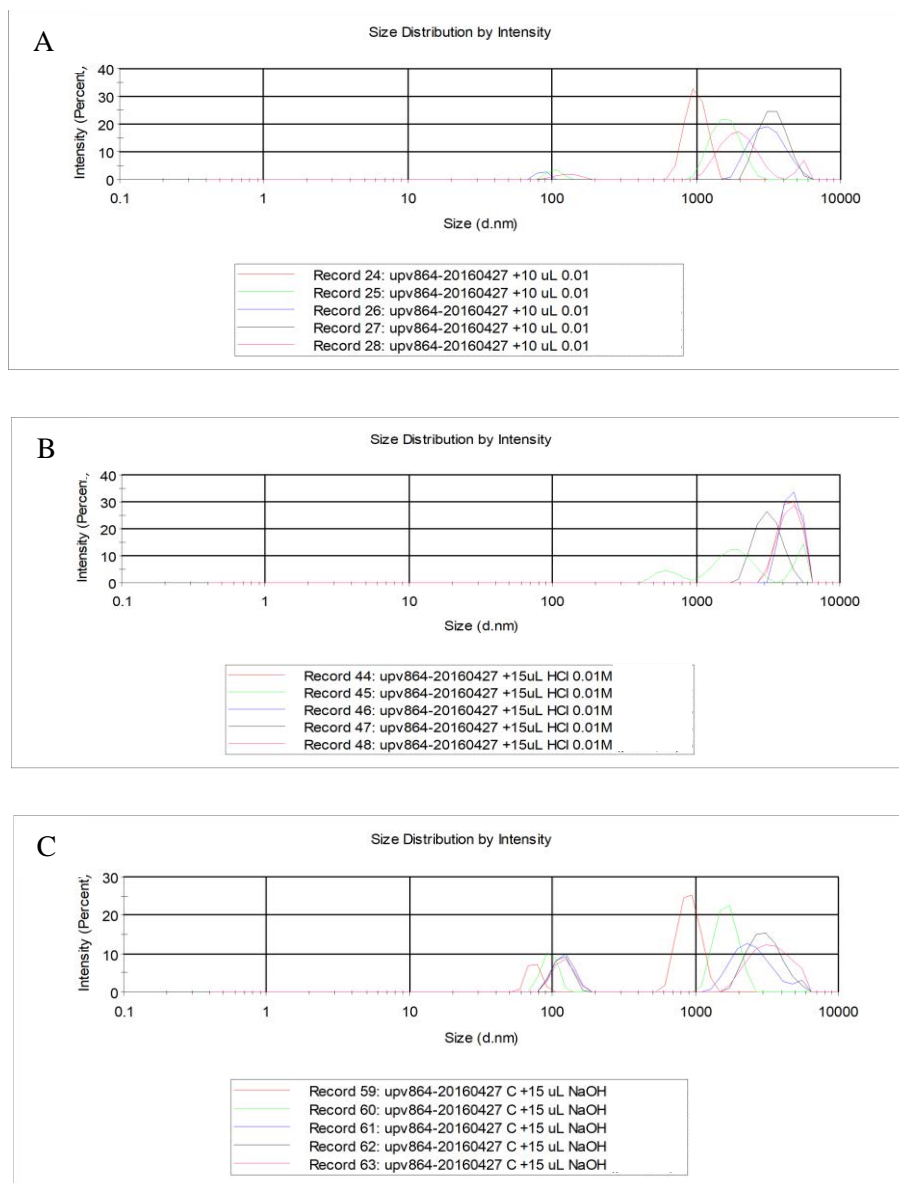


Figura 12. Gràfic de distribució de les mides (nm) en funció de la intensitat (%) de l'estoc B a pH 7.3 (A), 7.2 (B) i 8.9 (C).

Taula 20. Composició dels estocs B1, B2 i B3.

Composició dels estocs		
B1	B2	B3
Tris 10 mM- HCl pH 8.0 MgCl ₂ 1mM NaCl 75 mM 7% (p/v) trehalosa 2% (p/v) manitol 1% (p/v) sacarosa	Tris 25 mM - Glicina 0.192 M pH 8.5 MgCl ₂ 1mM NaCl 75 mM 5% (p/v) trehalosa	Tris 25 mM - Glicina 0.192 M pH 8.5 MgCl ₂ 1mM NaCl 75 mM 7% (p/v) trehalosa 2% (p/v) manitol 1% (p/v) sacarosa

Comparant els resultats de la taula 19 de l'estoc B amb els de la taula 20 de l'estoc B1, B2 i B3, es va observar una disminució de la polidispersió i una fixació de l'estat d'agregació, ja que no varia pràcticament en 2 h el *Z-average* i el pdi en tots tres estocs. Tenint en compte que no s'ha realitzat una purificació de novo d'Ad5, sinó que s'ha fet un bescanvi d'un estoc el qual ja estava prèviament agregat, la disminució del pdi podria indicar una disminució de l'agregació i una tendència a l'estabilització en estocs que siguin purificats en solucions a pH 8 o 8.5. A més, es va observar que la presència d'una major concentració d'excipients crioprotectors i lioprotectors redueix la mida de la partícula, fet que podria explicar-se si la solució de l'estoc B3 protegís i estabilitzés l'Ad5. Si l'estoc B3 no derivés d'un estoc que ja fou exposat a un pH 7.4, possiblement el canvi observat hagués estat més dràstic i milloraria notablement. Per aquest motiu, es va plantejar purificar un nou estoc amb la mateixa solució que B3 per tal d'estudiar l'efecte real sobre l'estabilització de les càpsides. D'altra banda, no s'observa una reversibilitat de l'agregació induïda pel pH, ja que no hi ha una millora significativa del *Z-average* i el pdi. De manera que la hipòtesi d'una reversió parcial de l'agregació queda descartada (Taula 21).



Taula 21. Resultats de l'evolució de Z-average i pdi de l'estoc B1, B2 i B3.

Temps (h)	Estoc B1		Estoc B2		Estoc B3	
	Z-average (nm)	pdi	Z-average (nm)	pdi	Z-average (nm)	pdi
t ₀	3725	0.20	2697	0.27	2410	0.50
1	2673	0.28	3101	0.24	2540	0.51
2	3802	0.20	3202	0.25	2290	0.43

Així doncs, tenint en compte l'inconvenient de que B1, B2 i B3 eren estocs que derivaven d'un estoc que ja havia estat exposat a un pH inferior i podia esbiaixar el resultat, es van produir i purificar dos estocs nous. Un d'ells, l'estoc D, estava compost per la mateixa solució que l'estoc B3. Paral·lelament, es va purificar un estoc E amb la mateixa composició a més d'albumina al 0.4% (p/v), ja que s'ha vist en el lot LP0243_26 el seu benefici. Es va mesurar la mida de partícula i el pdi dels estocs D i E a temps 0, i es va determinar la seva evolució a temperatura ambient fins a les 5 h per tal de veure l'estabilitat que confereix el pH de la solució i la seva composició (Taula 22). Simultàniament, es va determinar el títol funcional dels dos estocs després de dos cicles de congelació-descongelació per assegurar que no hi ha una pèrdua de funcionalitat durant el procés de fabricació, ja que a escala laboratori requereix de dues congelacions (Taula 23).

Taula 22. Resultats de l'evolució de Z-average i pdi de l'estoc D i E.

Temps (h)	Estoc D		Estoc E	
	Z-average (nm)	pdi	Z-average (nm)	pdi
t ₀	154	0.07	145	0.04
1	155	0.09	146	0.06
2	157	0.16	147	0.05
3	165	0.16	147	0.06
4	263	0.31	150	0.07
5	570	0.54	151	0.06



Taula 23. Títol funcional (UI/mL) i la pèrdua de funcionalitat (%) de l'estoc D i E després de dos cicles de congelació a -80°C i descongelació a temperatura ambient.

Estoc	Títol funcional inicial (UI/mL)	Títol funcional després de 2 cicles (UI/mL)	Pèrdua de funcionalitat (%)
D	2.56E11	2.01E11	21
E	3.45E11	3.57E11	0

Tant l'estoc D com l'estoc E presentaven una mida de partícula adequada a temps 0, ja que una mida de 145 – 154 nm equivaldria al diàmetre hidrodinàmic de l'Ad5 de 117 nm si tenim en compte els múltiples excipients de la solució que interaccionen amb la partícula vírica. A temps 0 ambdós estocs tenien una polidispersió molt baixa i per tant, les solucions en les que han estat purificats són estabilitzadores de l'Ad5. No obstant, l'evolució d'aquests amb el pas del temps és diferent. En l'estoc E es va mantenir constant la mida de la partícula i la polidispersió mentre que en l'estoc D va anar empitjorant amb el pas del temps. De manera que el canvi de pH i l'addició d'albumina va permetre estabilitzar l'Ad5 en solució a un mínim de 5 h a temperatura ambient.

En aquest punt, calia comprovar si aquesta millora a nivell d'agregació implicava a una millora en l'estabilitat funcional de l'Ad5. Aquest fet garantiria el mínim d'estabilitat en solució requerit per un procés a escala industrial com a pas previ a la liofilització i per tant, seria una composició potencialment candidata per a estabilitzar l'Ad5 en estat sòlid. Es va corroborar que l'estabilitat conferida per l'albumina a nivell d'agregació també s'observa a nivell de funcionalitat, ja que aquesta permet estabilitzar en solució i conferir una resistència a l'estrès de congelació i descongelació (Taula 23).

D'altra banda, es van fabricar dos lots d'Ad5 amb l'objectiu d'analitzar el tamany de partícula i la polidispersió del liofilitzat. D'aquesta manera seria possible identificar si la liofilització i la posterior reconstitució alteren a curt termini les condicions inicials de l'estoc. Els dos lots van ser LP0243_59 i LP0243_60, preparats a partir dels estocs D i E, respectivament. Es va observar que l'albumina estabilitzava al liofilitzat a temps 0 en el lot a nivell similars a l'estoc E (Taula 22 i 24). No obstant, a partir de les 2 h evoluciona desfavorablement augmentant la polidispersió i per tant, el liofilitzat reconstituït no és estable molt més enllà de 3 h a temperatura ambient. L'augment de la polidispersió amb el

pas del temps indica que es van experimentant canvis a nivell d'agregació. Probablement, les partícules de 200-300 nm del lot LP0243_60 siguin dímer o trímers. La geometria de la càpsida vírica i la disposició de les càpsides en un agregat d'Ad5 justificaria les mides d'aquest rang. Aquest fet es tradueix en que el temps entre la reconstitució i l'administració ha de ser ràpid per evitar l'agregació. En el cas del lot LP0243_59 a temps 0 la mida de partícula ja era d'aproximadament el doble amb una polidispersió relativament alta. Aquest evoluciona desfavorablement de forma ràpida i per tant, la composició de LP0243_59 no confereix la protecció suficient en el liofilitzat reconstituït.

Taula 24. Resultats de l'evolució de Z-average i pdi dels lots LP0243_59 i LP0243_60.

Temps (h)	LP0243_59 (estoc D)		LP0243_60 (estoc E)	
	Z-average (nm)	pdi	Z-average (nm)	pdi
t ₀	205	0.32	156	0.21
2	1001	0.66	219	0.32
3	1530	0.74	269	0.33

4.7. AVALUACIÓ DE L'IMPACTE FUNCIONAL DEL pH 8.5

Donat que la formulació amb la composició tampó base 3 amb 7% (p/v) trehalosa, 2% (p/v) manitol, 1% (p/v) sacarosa i 0.4% (p/v) d'albúmina va permetre estabilitzar l'Ad5 a nivell d'agregació, calia comprovar si impactava positivament en l'estabilitat funcional i reduïa les pèrdues de funcionalitat obtingudes fins al moment. Es va fabricar el lot LP0243_81 amb aquesta formulació i un lot addicional, LP0243_82, amb un 15% de sòlids total, és a dir, es va mantenir la ratio 7:2:1 de trehalosa, manitol i sacarosa, incrementant del 10% (p/v) al 15% (p/v) en sòlid (Taula 25). Aquest increment de sòlids permetria veure si el que d'entrada podria ser una avantatge per l'estructura de la pastilla liofilitzada millorant l'aspecte i la consistència, ho era a nivell d'estabilitat funcional.

Donat que la composició de la formulació ha canviat respecte les propostes inicials, es va dur a terme un anàlisi tèrmic per DSC i FDM per dissenyar un cicle adequat als nous requeriments (Figura 13). La recepta del cicle va ser: congelació a -55°C 6 h, assecat primari a -40°C 40 h i assecat secundari amb una rampa de 10h fins assolir els 30°C i es manté 8 h.



Les noves formulacions ja no requerien d'una etapa d'*annealing* donat que aquest no facilita el procés de liofilització. Es va establir un assecat secundari a 30°C tenint en compte que s'havia comprovat que no tenia un impacte perjudicial en l'activitat de l'Ad5 a temps 0 respecte un assecat secundari a 10°C.

Es van fabricar els dos lots a partir d'un estoc amb un títol funcional normalitzat de 2.37E10 UI/mL.

Taula 25. Composició dels lots LP0243_81 i LP0243_82.

Lots	Composició						
	Tris 25 mM - Glicina 0.192 M pH 8.5, MgCl ₂ 1mM, NaCl 75 mM						
	Trehalosa (% p/v)	Manitol (% p/v)	Sacarosa (% p/v)	PS-80 (% p/v)	Histidina (mM)	EDTA (μM)	Albúmina (% p/v)
LP0243_81	7	2	1	-	-	-	0.4
LP0243_82	10.5	3	1.5	-	-	-	0.4

Tant LP0243_81 com LP0243_82 van mantenir el títol funcional en solució, ja que no canvia pràcticament respecte el títol normalitzat de l'estoc de 2.37E10 UI/mL (Taula 26). Així doncs, es va solventar la pèrdua en solució experimentada a -80°C que s'havia observat amb l'augment de la concentració vírica a 1E12 pv/mL i es garanteix un valor inicial del lot abans de liofilitzar.

D'altra banda, es va observar que la pèrdua total acumulada que inclou el procés de fabricació i la estabilitat 6 mesos a -20°C havia disminuït respecte a la pèrdues dels lots anteriors en els que només es tenen en compte algunes parts del procés. Amb la formulació de LP0243_82 es va conferir el doble de crioprotecció i lioprotecció que a LP0243_81 estabilitzant el virus en solució a -80°C i alhora en estat sòlid. Per tant, l'augment de sòlids ha afavorit l'estabilització de l'Ad5 (Taula 26). Si la formulació conferís una protecció suficient en solució almenys en refrigeració es garantiria una finestra de temps en la fabricació a escala industrial.

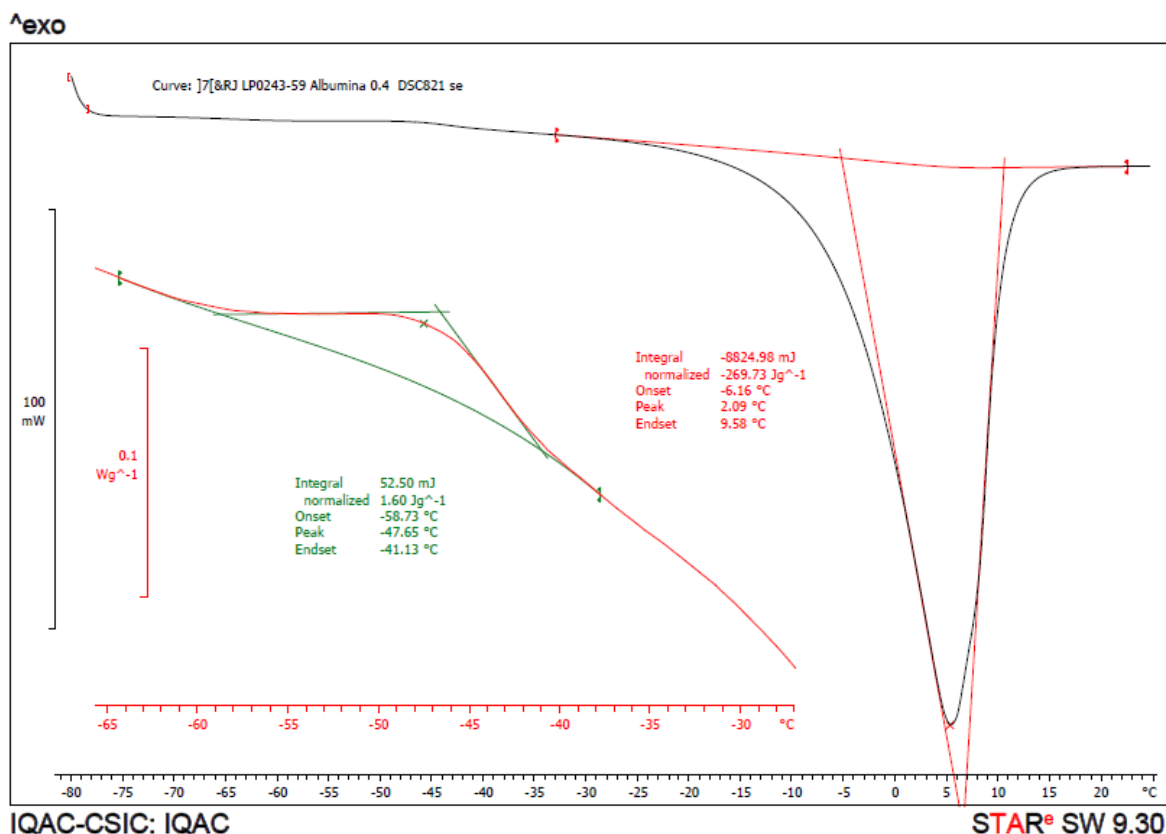


Figura 13. Anàlisi per DSC de la formulació del lot LP0243_81: Tris 25 mM - Glicina 0.192 M pH 8.5, MgCl₂ 1mM, NaCl 75 mM, 7% (p/v) trehalosa, 2% (p/v) manitol, 1% (p/v) sacarosa i 0.4% (p/v)

Taula 26. Titulació funcional (UI/mL) dels lots LP0243_81 i LP0243_82 en l'estabilitat a -20°C durant 6 mesos i la pèrdua acumulada (%) en el procés tenint en compte que l'estoc de partida té un títol funcional normalitzat de 5.37E10 UI/mL.

Lots	Solució t ₀	Temps d'estabilitat a -20°C (mesos)		Pèrdua acumulada (%)
		3	6	
LP0243_81	2.25E10	6.56E9	8.23E9	65
LP0243_82	2.30E10	2.00E10	1.56E10	34

Es va testar el tampó Tris 25 mM - Glicina 0.192 M pH 8.5, però no s'havia provat un tampó Tris-HCl a la mateixa concentració molar i al mateix pH, és a dir, Tris 25 mM – HCl pH 8.5. Així doncs, es va decidir fabricar dos lots amb una composició del 15% de sòlids amb els dos tampons per tal d'escollir aquell que fós més adequat per al procés complet de fabricació



i l'estabilització durant l'emmagatzematge a llarg termini. Es va fer un estudi d'estabilitat a curt termini de 6 mesos a les condicions d'estabilitat de -20°C, 5°C i 25°C. El lot LP0243_86 es va fabricar amb la composició del lot LP243_82, però amb el tampó Tris 25 mM - HCl pH 8.5. Aquest es va preparar a partir d'un estoc amb un títol normalitzat de 9.57E10 UI/mL. En canvi, el lot LP0243_87 amb la composició equivalent a LP0243_82, es va fabricar a partir d'un estoc amb un títol normalitzat de 9.61E10 UI/mL. Es va aplicar la mateixa recepta de cicle que pels lots LP0243_81 i LP0243_82.

Taula 27. Titulació funcional (UI/mL) dels lots LP0243_86 i LP0243_87 en estudi d'estabilitat 6 mesos.

Lots	Solució 5°C	Solució -80°C	Liofitzat t ₀	Estabilitat (mesos)	
				Condicions	6
LP0243_86	9.49E10	8.90E10	3.35E10	-20°C	3.37E10
				5°C	3.26E10
				25°C	1.54E9
LP0243_87	8.30E10	8.57E10	4.28E10	-20°C	3.24E10
				5°C	3.19E10
				25°C	9.12E8

Es va analitzar la solució d'ambdós lots després de 8 h en refrigeració i 24 h a -80°C i no van experimentar pèrdues. Una pèrdua del 14% pot considerar-se menyspreable tenint en compte la precisió del mètode establert (veure annex 3). Així doncs, amb qualsevol de les dues formulacions s'aconsegueix estabilitzar l'Ad5 en solució donant-nos una finestra de temps d'almenys 8 h a 5°C en el procés de fabricació. A més, garanteix un valor inicial del títol funcional del lot en solució per poder conèixer la pèrdua de funcionalitat real experimentada a la liofilització (veure Taula 27 i 28).



Taula 28. Pèrdua de funcionalitat (%) dels lots LP0243_86 i LP0243_87 en cada una de les etapes i a nivell global tenint en compte que s'han fabricat a partir d'un estoc amb un títol funcional normalitzat de 9.57E10 UI/mL i 9.61E10 UI/mL, respectivament.

Lots	Pèrdua de funcionalitat (%)					
	Solució a 5°C	Solució a -80°C	Liofilització	Estabilitat 6 mesos		Acumulada
LP0243_86	1	7	63	-20°C	0	63
				5°C	3	66
				25°C	95	98
LP0243_87	14	11	50	-20°C	24	66
				5°C	25	67
				25°C	98	99

A nivell d'estat sòlid, el tampó amb glicina confereix major lioprotecció obtenint una pèrdua inferior en el procés de liofilització. En canvi, en estabilitat hi ha un escenari favorable amb el tampó amb HCl. Aquest fet va fer que la pèrdua global fós equivalent en les dues formulacions. Cal destacar que el comportament en estabilitat intra-formulació a les condicions de 5°C i -20°C va ser equivalent. Per tant, les formulacions termoestabilitzen l'Ad5 d'igual manera a les dues condicions d'emmagatzematge com a mínim fins als 6 mesos.

La pèrdua de funcionalitat en estabilitat generalment ve donada per l'excés d'humitat residual de la pastilla liofilitzada o per l'augment d'humitat degut a la cèssió d'aigua del tap. La humitat residual és resultat de la temperatura i la durada establerta a l'assecat secundari. En canvi, la pèrdua d'activitat en solució o en el procés de liofilització és causada per la falta de crioprotecció i lioprotecció dels excipients. Tot i que en el procés de liofilització també pot afectar la temperatura i la durada de l'assecat secundari si no s'ha comprovat prèviament que els paràmetres seleccionats no són perjudicials per l'estabilització de l'Ad5 a temps 0. Tenint en compte que la composició d'excipients havia estat optimitzada i l'assecat secundari no, qualsevol de les formulacions era susceptible de millorar reduint les pèrdues de funcionalitat en liofilització i en estabilitat. Essent el tampó amb glicina el que presentava una pèrdua inferior abans de l'emmagatzematge, aquest era més idoni i potenciament el candidat a formar part de la formulació final. No obstant, calia optimitzar



l'assecat secundari per reduir i homogeneïtzar les pèrdues, ja que entre el lot LP0243_82 i LP0243_87 la pèrdua acumulada ins a 6 mesos a -20°C augmenta d'un 34% a un 63%.

4.8. APROXIMACIÓ INICIAL DE L'OPTIMITZACIÓ DE L'ASSECAT SECUNDARI

La formulació estabilitzadora d'Ad5 havia estat optimitzada a nivell de composició, però no s'havia optimitzat el cicle de liofilització. La recepta del cicle es va anar modificant en base a les qualitats tèrmiques de les solucions per aconseguir un bon aspecte del liofilitzat i evitar el col·lapse. Tanmateix, no s'havia optimitzat el cicle en termes d'humitat i funcionalitat. Tenint en compte que un dels paràmetres crítics és la humitat residual del liofilitzat, era necessari estudiar l'impacte de la humitat en la funcionalitat de l'Ad5 per tal de correlacionar aquests dos paràmetres i alhora, definir quins nivells d'humitat són òptims per l'estabilització de l'Ad5 en la formulació candidata. Així doncs, l'objectiu va ser determinar la temperatura i el temps d'assecat secundari que oferís una millor protecció, fet que permetria allargar la vida útil del producte.

Per aquesta optimització de l'assecat secundari es van analitzar les temperatures de 30°C i 10°C que ja havien estat testades prèviament en els lots fabricats i no s'havia identificat que causessin una pèrdua de funcionalitat significativa. A més, aquestes eren lo suficientment diferents per analitzar el rang d'humitats que permetien assolir cada una en una exposició de màxim 20 h.

4.8.1. Selecció d'extraccions a un assecat secundari de 10°C i 30°C

Es van fabricar dos lots d'excipients, un lot per a cada una de les temperatures. El cicle 1 analitzat a 10°C va ser: congelació a -55°C 6 h, assecat primari a -40°C 50 h i assecat secundari amb una rampa de 7 h fins assolir els 10°C . El cicle 2 analitzat a 30°C va ser: congelació a -55°C 6 h, assecat primari a -40°C 50 h i assecat secundari amb una rampa de 10 h fins assolir els 30°C . En ambdós casos, es van analitzar diferents extraccions fins a les 20 h d'exposició per tal d'avaluar l'homogeneïtat del lot a una determinada temperatura i temps, i conèixer el rang d'humitat assolit a cada temperatura. Es va mesura la humitat residual de cada extracció per triplicat. Les extraccions realitzades a cada cicle van ser: (1) a les 6 h, 8 h, 10 h, 12 h, 14 h i 20 h, i (2) a les 4 h, 6 h, 8 h, 10 h, 12 h i 20 h.



De les 6 extraccions de cada cicle es van escollir dues en base a l'homogeneïtat del lot a cada extracció i/o amb el requisit que la diferència d'humitat entre les dues extraccions seleccionades fós superior al 1%. Entre vials d'una mateixa extracció pot haver una diferència de fins a un 1%, i si es vol estudiar l'impacte de la humitat en la funcionalitat, és necessària una diferència mínima d'un 1%.

Del cicle 1 amb l'assecat secundari a 10°C amb un rang d'humitat de 2.6% a 4.7% s'escullen les extraccions de 8 h i 20 h. Tot i no ser les dues que presentaven un menor coeficient de variació, entre aquestes hi ha una diferència d'humitat superior al 1%. Entre vials d'una mateixa extracció pot haver una diferència de fins a un 1%, i si es vol estudiar l'impacte de la humitat en la funcionalitat, és necessària una diferència mínima d'un 1%. En el cas del cicle a 30°C, d'un rang d'humitat de 0.7% a 2.6% s'escullen les extraccions a 4 h i 10 h. Aquestes extraccions eren les més homogènies i hi ha una diferència d'humitat alta per a comparar l'efecte a nivell de funcionalitat d'un temps d'exposició superior a 30°C (Taula 29).

Taula 29. Resultats de la humitat promig de cada extracció del cicle amb assecat secundari a 10°C (1) i 30°C (2), a més del coeficient de variació (%) de cada extracció.

Assecat secundari a 10°C (cicle 1)						
Temps (h)	6	8	10	12	14	20
Humitat promig (%)	4.7	3.7	3.5	3.1	3.0	2.6
CV(%)	16	9	12	9	15	22
Assecat secundari a 30°C (cicle 2)						
Temps (h)	4	6	8	10	12	20
Humitat promig (%)	2.6	2.4	1.5	1.2	1.0	0.7
CV(%)	6	19	41	12	16	30

4.8.2. Avaluació de la funcionalitat a les extraccions seleccionades

Es va avaluar la funcionalitat de les dues extraccions seleccionades a cada temperatura i es va dur a terme una estabilitat accelerada d'1 mes a 25°C per a seleccionar l'extracció que permet obtenir una menor pèrdua a temps 0 i en estabilitat a curt termini. Es van fabricar dos



lots de la formulació candidada amb un assecat secundari a 10°C i 30°C a partir d'un estoc amb un títol funcional normalitzat de 5.39E10 UI/mL. El lot LP0243_94 es va liofilitzar amb un assecat secundari a 30°C i el lot LP243_96 a 10°C.

Taula 30. Títol funcional (UI/mL) dels lots LP0243_94 i LP0243_96.

Lots	Solució a -80°C	Extracció	Liofilitzat t ₀	Humitat t ₀ (%)	Estabilitat 1 mes a 25°C
LP0243_94	6.06E10	4 h	3.44E10	1.9	1.94E10
		10 h	2.73E10	1.4	8.38E9
LP0243_96	4.95E10	8 h	3.53E10	3.5	2.70E10
		20 h	2.67E10	2.6	2.11E10

Taula 31. Pèrdua de funcionalitat (%) a cada etapa del procés dels lots LP0243_94 i LP0243_96 en una estabilitat de 1 mes a 25°C tenint en compte que es fabriquen a partir d'un estoc amb títol funcional normalitzat de 5.39E10 UI/mL.

Lots	Temperatura d'assecat secundari	Pèrdua de funcionalitat (%)				
		Solució - 80°C	Extracció	Liofilització	Estabilitat 1 mes 25°C	Acumulada
LP0243_94	30°C	0	4 h	36	44	64
			10 h	49	69	85
LP0243_96	10°C	8	8 h	35	24	50
			20 h	50	21	61

Entre una temperatura de 10°C i 30°C no va haver diferències en quant a pèrdua de funcionalitat en liofilització, el que confirma que la formulació ofereix una crioprotecció i lioprotecció independentment de l'assecat secundari sempre i quant aquest no sigui molt agressiu. A més, es va observar que en ambdós casos un temps d'exposició major impacta negativament en la funcionalitat, ja que la pèrdua en liofilització era superior en el temps d'exposició més llarg. De manera que per a reduir la humitat és més adequat augmentar la temperatura de l'assecat secundari que allargar el temps d'exposició a una certa temperatura (Taula 30 i 31).



Figura 14. Dos vials del lot LP0243_96 corresponents a l'extracció de 8h (esquerra) i dos vials del lot LP0243_94 corresponents a l'extracció de 4h (dreta).

D'altra banda, la humitat de lot liofilitzat a 30°C era inferior al lot liofilitzat a 10°C, el que va en línia amb el fet que la temperatura i durada de l'assecat secundari defineixen els nivells d'humitat. Amb les dades d'estabilitat a 1 mes a 25°C no es va observar que un major grau d'humitat de l'ordre de 3% impactés negativament enfront a una humitat inferior d'aproximadament 1.5%. Tanmateix, cal tenir en compte que s'estava avaluant un mes i únicament la condició accelerada de 25°C, no les condicions reals d'emmagatzematge.

En quant a la caracterització física del liofilitzat, el lot LP0243_96 no presentava un aspecte uniforme. La pastilla liofilitzada estava encongida degut a un col·lapse macroscòpic, fet que dificultava la seva reconstitució (Figura 14). De manera que a nivell d'aparença i adequació física, el lot LP0243_94 era més idoni

En aquest punt, era necessari avaluar la funcionalitat de les dues extraccions de curta exposició, 4 h a 30°C i 8 h a 10°C, en un estudi d'estabilitat de com a mínim 3 mesos a les condicions reals d'emmagatzematge per a determinar si la humitat podia ser causa o no d'una pèrdua significativa de funcionalitat a llarg termini.

4.8.3. Avaluació de l'estabilitat de l'Ad5 amb els cicles de liofilització proposats

Es van fabricar dos lots, LP0243_98 i LP0243_100, amb el cicle definit amb un assecat de 4 h a 30°C i assecat secundari de 10 h a 10°C, respectivament. Es va fer un estudi d'estabilitat

de 3 mesos per tal d'avaluar l'estabilitat de l'Ad5 en les possibles condicions d'emmagatzematge del producte final, -20°C i 5°C, a més de la condició accelerada a 25°C. Es va determinar el títol funcional i la humitat per duplicat en cada punt d'anàlisi. El lot LP0243_98 es va fabricar a partir d'un estoc amb un títol funcional normalitzat de 1.16E10 UI/mL. I el lot LP0243_100 es va fabricar a partir amb un títol funcional normalitzat de 2.07E10 UI/mL.

Taula 32. Títol funcional (UI/mL) de l'estabilitat de 3 mesos a 25°C, 5°C i -20°C dels lot LP0243_98 i LP0243_100, i les humitats (% aigua) de cada punt d'anàlisi.

Lots	Liofilitzat t ₀		Estabilitat (mesos)				
			Condicció	1		3	
	Títol funcional (UI/mL)	Humitat (%)		Títol funcional (UI/mL)	Humitat (%)	Títol funcional (UI/mL)	Humitat (%)
LP0243_98	7.14E9	2.0	-20°C	7.49E9	1.8	8.03E9	1.5
			5°C	7.22E9	1.7	7.64E9	2.0
			25°C	4.64E9	2.1	4.28E9	2.2
LP0243_100	1.50E10	3.5	-20°C	1.33E10	3.2	7.36E9	3.4
			5°C	1.19E10	3.5	5.95E9	4.0
			25°C	9.46E9	3.4	5.43E9	ND*

*ND: No determinable

Com es pot observar a la Taula 32, la humitat es va mantenir pràcticament invariable en els 3 mesos d'emmagatzematge en ambos lots, amb un diferència de com a màxim 0.5%, tret del punt d'anàlisi de 3 mesos a 25°C del lot LP0243_100. En aquest punt no va ser possible determinar la humitat, ja que no es reconstituïa la pastilla de forma completa amb el solvent utilitzat. L'aspecte del liofilitzat LP0243_100, igual que en el lot LP0243_96, era esponjós i la pastilla estava encongida. I conseqüentment, la reconstitució amb aigua per injecció també va requerir més temps. Aquest fet s'explica pel col·lapse. El liofilitzat a temps 0 presentava un col·lapse, ja observat en el lot LP0243_96, degut al grau d'humitat inicial. Aquest es va accentuar a 25°C amb la cessió de l'aigua del tap, el que va causar compactació que dificultava la seva reconstitució.



En quant a funcionalitat, el lot LP0243_100 va experimentar una lleugera pèrdua de funcionalitat a 1 mes a 5°C i -20°C, mentre que LP0243_98 es manté estable. No obstant, en els dos lots es va observar una disminució d'activitat a 25°C. Així doncs, independentment del grau d'humitat, de nou es va observar que la temperatura de 25°C provoca canvis en l'estructura el liofilitzat que causen una pèrdua d'activitat (Taula 32 i 33). Aquests canvis podrien anar lligats amb el fet que aquesta temperatura confereix una major mobilitat a l'estructura, el que es tradueix en una major reactivitat dels components. Aquesta reactivitat es veu accentuada en el lot LP0243_100 on la humitat era superior. De manera que una humitat residual superior al 3% provoca canvis a nivell estructural que alteren l'estabilitat de l'Ad5.

D'altra banda, la pèrdua de funcionalitat en estabilitat en les tres condicions és superior a LP0243_100, el que significa que la humitat, la única diferència entre els lots, compromet l'activitat de l'Ad5 durant l'emmagatzematge. De manera que el grau d'humitat és crucial i determinant per a una estabilitat a llarg termini de l'Ad5.

Taula 33. Pèrdua de funcionalitat (%) en el procés de liofilització i en estabilitat dels lots LP0243_98 i LP0243_100.

Lots	Pèrdua en liofilització (%)	Condicció	Pèrdua en estabilitat a 1 mes (%)	Pèrdua en estabilitat a 3 mesos (%)
LP0243_98	38	-20°C	0	0
		5°C	0	0
		25°C	35	40
LP0243_100	28	-20°C	11	51
		5°C	21	60
		25°C	37	64

Tenint en compte els resultats anteriors, una temperatura de 30°C permet assolir un grau d'humitat inferior favorable per a l'estabilització de l'Ad5. I a més, a un temps d'assecat secundari de 4 h a 30°C es van obtenir pèrdues en liofilització pràcticament equivalents a les d'un assecat secundari de 8 h a 10°C. Per tant, l'augment de temperatura no impacta negativament en la funcionalitat del liofilitzat a temps 0. Això juntament amb el fet que

LP0243_100 té un perfil físic i funcional favorable en una estabilitat de 3 mesos tant a 5°C com a -20°C, va fer que se seleccionés el cicle de liofilització de LP0243_100 per a l'estudi d'estabilitat a llarg termini de la formulació candidata.

4.9. ESTUDI D'ESTABILITAT A LLARG TERMINI

En aquest punt del desenvolupament, ja s'havia identificat una formulació que permetia estabilitzar l'Ad5 en solució com a mínim 8 h en refrigeració i 24 h a -80°C. Alhora, aquesta formulació amb la primera optimització del cicle de liofilització permetia estabilitzar l'Ad5 en estat sòlid amb una pèrdua de funcionalitat en el procés de liofilització d'aproximadament un 35% que es mantenia constant a 5°C i -20°C almenys fins a 3 mesos. Així doncs, era necessària avaluar l'efectivitat protectora de la formulació amb el cicle seleccionat a llarg termini.

Es va iniciar un estudi d'estabilitat a llarg termini seguint les recomanacions de la guia de la FDA Q1A(R2) establint un temps d'emmagatzematge de 6 mesos per a 25°C i de 2 anys a les condicions de 5°C i -20°C [International Conference on Harmonization, 2003]. Aquest estudi en marxa, permetrà conèixer el perfil d'estabilitat a cada temperatura i establir les especificacions del producte. Es va dissenyar un protocol d'estabilitat on en cada punt d'anàlisi s'examinessin tots els atributs crítics identificats al llarg del desenvolupament: aparença del liofilitzat, temps de reconstitució, pH, tamany de partícula i polidispersió, títol físic, títol funcional i humitat (veure annex 5 i 6). Paral·lelament, s'avalua l'estabilitat a temperatura ambient a 8 h per a identificar si és possible facilitar el procés de fabricació a escala industrial evitant la refrigeració.

Per una banda, es va fabricar el lot LP0243_102 a partir d'un estoc amb un títol funcional normalitzat de 2.54E10 UI/mL per avaluar l'estabilitat en solució a temperatura ambient a 8 h. Aquest lot permetria comprovar si la formulació candidata permet una fabricació a temperatura ambient amb una finestra de temps suficient per a garantir l'estabilitat de l'Ad5 fins a l'inici de la liofilització. D'altra banda, es va fabricar un segon lot LP0243_103 a partir d'un estoc amb títol funcional normalitzat de 2.18E10 UI/mL per a dur a terme una estabilitat completa de 2 anys. La composició dels dos lots és la de la formulació candidata: Tris 25 mM - Glicina 0.192 M pH 8.5, MgCl₂ 1mM, NaCl 75 mM, 10.5% (p/v) trehalosa, 3% (p/v) manitol, 1.5% (p/v) sacarosa i 0.4% (p/v) d'albumina. Aquest va ser liofilitzat amb la recepta

de cicle optimitzada: congelació a -55°C 6 h, assecat primari a -40°C 50 h i assecat secundari amb una rampa de 10 h fins assolir els 30°C que es manté durant 4 h.

L'estabilitat en solució a temperatura ambient va mostrar que l'Ad5 és estable en solució. I per tant, aquesta formulació garanteix una finestra de temps de com a mínim 8 h a temperatura ambient abans de liofilitzar. Això dóna robustesa al procés de fabricació i facilita l'escalat industrial (Taula 34).

Taula 34. Estabilitat en solució del lot LP0243_102 a temps 0, 2 h, 4 h i 8 h, i la pèrdua de funcionalitat (%) a cada temps.

Lot	Temps a temperatura ambient (h)	Títol funcional (UI/mL)	Pèrdua en solució (%)
LP0243_102	t ₀	2.60E10	0
	2	2.53E10	1
	4	2.49E10	2
	8	2.59E10	0

L'estudi d'estabilitat a llarg termini està en marxa i fins al moment es disposen de dades fins als 3 mesos. No s'ha observat una pèrdua de funcionalitat en el procés de liofilització, a diferència del lot LP0243_98. Tot i que és equivalent la composició entre lots i la recepta del cicle de liofilització aplicat, les pèrdues de funcionalitat en el procés de liofilització són diferents. El lot LP0243_103 té una mida aproximadament 10 vegades superior al lot LP0243_98. Habitualment es col·loquen vials buits a la safata del liofilitzador per compensar aquestes diferències per a que la transmissió de calor sigui el més homogènia possible, però la mida de lot pot interferir causant variacions entre lots. Per aquest motiu, després del desenvolupament d'un producte és important definir la mida de lot. No obstant, no ha estat possible determinar la causa exacta d'aquesta millora i s'han de fabricar lots equivalents a LP0243_103 per a tenir replicats i identificar les variacions existents. Un altre possible causa, és la falta d'una optimització completa de l'assecat secundari. L'optimització d'aquest ha estat parcial, ja que es van analitzar només les temperatures de 10°C i 30°C. S'ha de considerar la possibilitat d'optimitzar aquesta etapa en una segona aproximació on s'haurien de testar temperatures entre 15-25°C.



La formulació candidata liofilitzada amb el cicle parcialment optimitzat permet reduir les pèrdues en liofilització a valors d'entre 0-38%. Aquest escenari és favorable al presentat pel grup de Croyle amb una formulació basada en sacarosa amb una pèrdua inicial del 50%. I està en línia amb els estudis de Zhang i Kong amb una proposta amb trehalosa, manitol, albúmina i sacarosa que tan sols experimenta una pèrdua del 17%.

En quant a l'estabilitat durant l'emmagatzematge, les dades acumulades fins a 3 mesos reproduïxen les dades del lot LP0243_98. No hi hagut pèrdues a 5°C i -20°C fins als 3 mesos (veure taula 35 i 36). Al disposar de poques dades no és possible predir el comportament més enllà dels 3 mesos per tal de comparar amb l'estabilitat garantida d'1 any a 4°C del grup de Croyle, la pèrdua d'un 60% de funcionalitat als 17 mesos a 4°C de Zhang i Kong, o inclús la formulació líquida A195 del grup d'Evans amb una pèrdua del 10% en 2 anys a 4°C [Croyle *et al.*, 2001, Evans *et al.*, 2004, Zhang & Kong, 2008].

Taula 35. Títol funcional (UI/mL) de l'estabilitat del lot LP0243_103 a -20°C, 5°C i 25°C.

Lot	Liofilitzat t_0	Condicions	Estabilitat (mesos)	
			1	3
LP0243_103	2.21E10	-20°C	-	2.27E10
		5°C	-	2.12E10
		25°C	1.50E10	1.60E10

Taula 36. Pèrdua de funcionalitat (%) del lot LP0243_103 a les diferents etapes del procés tenint en compte que es fabrica a partir d'un estoc amb títol funcional normalitzat de 2.18E10 UI/mL.

Lot	Pèrdua de funcionalitat (%)			
	Solució a -80°C	Condicions	Liofilització	Estabilitat 3 mesos
LP0243_103	0	-20°C	0	0
		5°C		3
		25°C		27

Les pròximes fites són: (1) fabricar un segon lot per a tenir un duplicat del perfil d'estabilitat a llarg termini a les condicions seleccionades, (2) establir excursions a curt termini a 25°C i

30°C per garantir l'estabilitat de l'Ad5 a períodes curts de transport o manipulació i (3) avaluar l'estabilitat funcional en ús del producte un cop reconstituït.

4.10. ESTUDI DE L'IMPACTE DE pH A NIVELL PROTEIC

Donat que s'identifica el pH com a atribut crític per a l'agregació de l'Ad5 així com la conseqüent pèrdua de funcionalitat, es va dur a terme un breu anàlisi a nivell proteic amb els estocs d'Ad5 disponibles. L'objectiu va ser identificar l'impacte a nivell proteic del canvi de pH de 8.5 a 6, així com conèixer el nivell d'agregació i la geometria dels agregats causats pel pH. I alhora, realitzar un breu anàlisi del perfil proteic entre dues condicions de pH per identificar si proteïnes imprescindibles per al procés d'unió i infecció cel·lular com la *penton* i la *fiber* eren presents d'una forma diferencial. És a dir, si aquestes proteïnes es trobaven als estocs com a proteïnes lliures, truncades o associades a altres proteïnes.

4.10.1. Fraccionament per densitat dels estocs vírics

Es va realitzar un fraccionament per densitat d'un estoc víric amb un tampó pH 8.5, estoc F, i un a pH 6.0, estoc G, per tal d'analitzar el perfil proteic d'un estoc amb el pH de la formulació candidata i un pH més àcid a partir del qual es coneix que algunes proteïnes de l'Ad5 es desestabilitzen [Stewart & Burnett, 1995; Wiethoff *et al.*, 2000]. Aquest fraccionament va donar lloc a fraccions de 600 µL, de cf_01 a cf_21 de l'estoc F, i les fraccions de sf_01 a sf_21 de l'estoc G, el que va permetre separar per densitat les càpsides completes d'Ad5, les proteïnes lliures o complexes formats. La composició dels dos estocs era la mateixa: Tris 25 mM, Glicina 0.192 M, MgCl₂ 1 mM, NaCl 75 mM, 7% (p/v) trehalosa, 2% (p/v) manitol i 1% (p/v) sacarosa. Cap dels estocs contenia albúmina per poder dur a terme un anàlisi proteic adequat.

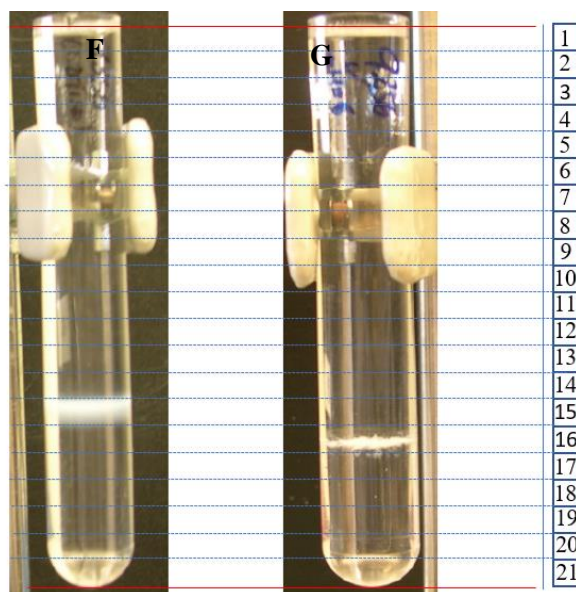


Figura 15. Aproximació de la distribució de les 21 fraccions de 600 μ L de menor a major densitat de l'estoc F a pH 8.5 de cf_01 a cf_21 (esquerra) i l'estoc G a pH 6.0 de sf_01 a sf_21 (dreta).

La banda de la fracció cf_15 i sf_16 de la Figura 15 correspon a una fracció amb càpsides completes d'Ad5, ja que la densitat d'aquestes és d'aproximadament 1.34 g/mL [Schmid & Hearing, 2008] (Taula 37). Aquesta fracció correspon a càpsides completes perquè es parteix d'un estoc d'Ad5 purificat, no un lliat, i per tant, ja s'han retirat prèviament les càpsides buides. Es va observar que la banda d'adenovirus de l'estoc F, és més ampla i per tant sembla tenir més partícules víriques que l'estoc G. A més, l'aspecte d'aquesta banda és equivalent a l'observat en el procés estàndard de purificació, a diferència de l'aspecte granulós i poc difús de la banda de la fracció sf_16. Aquest comportament estava causat per la presència d'agregats. Aquests van causar l'augment del pes molecular desplaçant la banda a densitats lleugerament superiors, i alhora, l'alteració de la solvatació fent que la dispersió sigui menor. Aquest fet explicaria que la banda sf_16 tingués un aspecte més compacte i presentés una densitat superior a cf_15 (Taula 37).



Taula 37. Densitats (g/mL) i volums post-diàlisi (μ L) de les fraccions cf_01 - cf_21 de l'estoc F i les fraccions sf_01 - sf_21 de l'estoc G.

Estoc F pH 8.4			Estoc G pH 6		
Fracció cf	Densitat (g/mL)	Volum post-diàlisi (μ L)	Fracció sf	Densitat (g/mL)	Volum post-diàlisi (μ L)
1	1.031	400	1	1.041	885
2	1.054	579	2	1.061	1070
3	1.058	520	3	1.066	498
4	1.088	522	4	1.081	935
5	1.104	1470	5	1.088	545
6	1.121	486	6	1.104	101
7	1.155	1500	7	1.131	470
8	1.195	403	8	1.175	485
9	1.201	472	9	1.186	360
10	1.206	252	10	1.218	103
11	1.243	595	11	1.230	546
12	1.262	467	12	1.252	494
13	1.277	447	13	1.272	115
14	1.280	1550	14	1.300	470
15	1.302	1229	15	1.315	585
16	1.355	420	16	1.345	480
17	1.367	515	17	1.350	490
18	1.364	509	18	1.362	460
19	1.369	530	19	1.375	540
20	1.456	620	20	1.406	560
21	1.381	481	21	1.409	568

Es van analitzar els volums de les fraccions i es va detectar una diferència de volum elevada respecte el volum inicial de cada fracció de 600 μ L. Tenint en compte la variabilitat que introdueix el propi mètode i que la recuperació de membrana no és sempre completa, s'esperava un volum post-diàlisi aproximat entre 400-650 μ L, però en algunes fraccions ha estat per sota o per sobre del valor esperat. De les fraccions on el volum era inferior a 400 μ L no es poden extreure dades fiables, ja que una disminució de volum només es pot explicar per una sortida d'aigua de la membrana deguda a que el casset de diàlisi sigui defectuós. Aquesta pèrdua d'aigua pot anar associada amb una sortida de proteïnes que alterin el contingut de la fracció i per tant, no es consideren vàlides les fraccions cf_10, sf_06, sf_09, sf_10 i sf_13.

L'augment del volum post-diàlisi de les fraccions cf_14 i cf_15 es pot explicar per l'alta concentració proteica. L'aigua entra al casset de diàlisi a través la membrana per equilibrar

la força iònica. Aquest fet no s'observa a la fracció sf_16. El fet que en aquesta fracció les càpsides estiguessin agregades podria explicar les diferències de comportament. En la resta de fraccions amb un volum superior a 400 µL, hi ha una entrada de volum que indica que la solució de dins de la membrana és més concentrada que la de l'exterior, ja sigui per proteïnes o excipients complexats que no travessen la membrana. Tanmateix, per assegurar aquest fenomen caldria repetir l'assaig amb i sense Ad5 per veure si es reproduïen els resultats. No és possible determinar quin és el component o el complex component-proteïna que interfereix en aquest procés amb les dades disponibles. Tot i tenir un volum superior en aquestes fraccions, es va assumir que les proteïnes presents eren les mateixes abans i després de dialitzar independentment de la concentració, de manera que es van considerar vàlides.

4.10.2. Anàlisi SDS-PAGE de les fraccions

Es van analitzar totes les fraccions dels dos estocs mitjançant SDS-PAGE amb l'objectiu de caracteritzar visualment el perfil i la càrrega proteica de cada una d'elles.

Es va identificar que la càrrega proteica es concentrava en les fraccions cf_03, cf_14, cf_15 i sf_16 (Figura 16 i 17). Tret de la fracció cf_03, de la resta de fraccions es podia intuir, ja que en el fraccionament de l'estoc s'identifiquen les bandes blanques de proteïna en aquestes fraccions. La càrrega proteica disminueix progressivament a les fraccions contigües a la fracció principal de cada estoc, cf_15 i sf_16, ja que la distribució espacial de les proteïnes ve donada per un pic amb una amplada variable segons la resolució del gradient de CsCl. En aquest cas, al ser un gradient discontinu, la resolució és inferior i el pic és més ample.

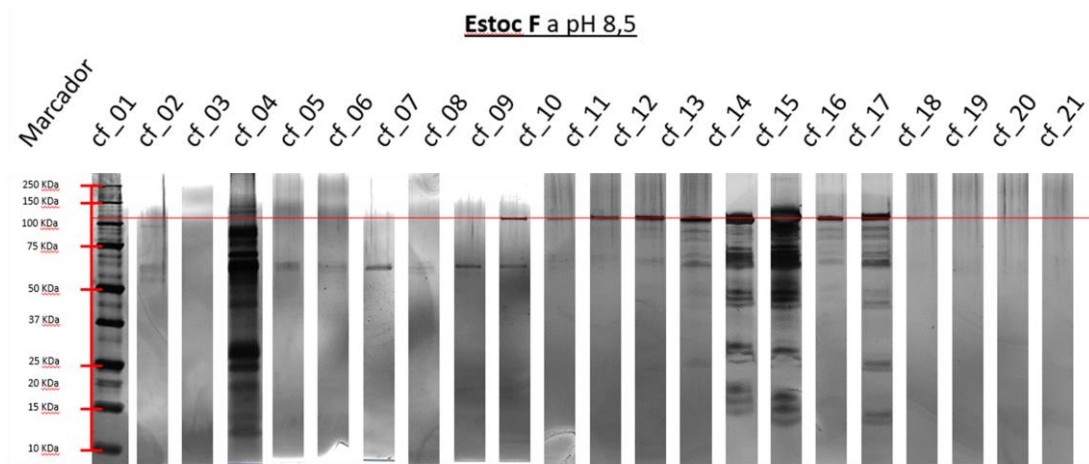


Figura 16. Compil·lació de les 21 fraccions de l'estoc F a pH 8.5. Es marca una guia en la proteïna majoritària, *hexon* (108 KDa).

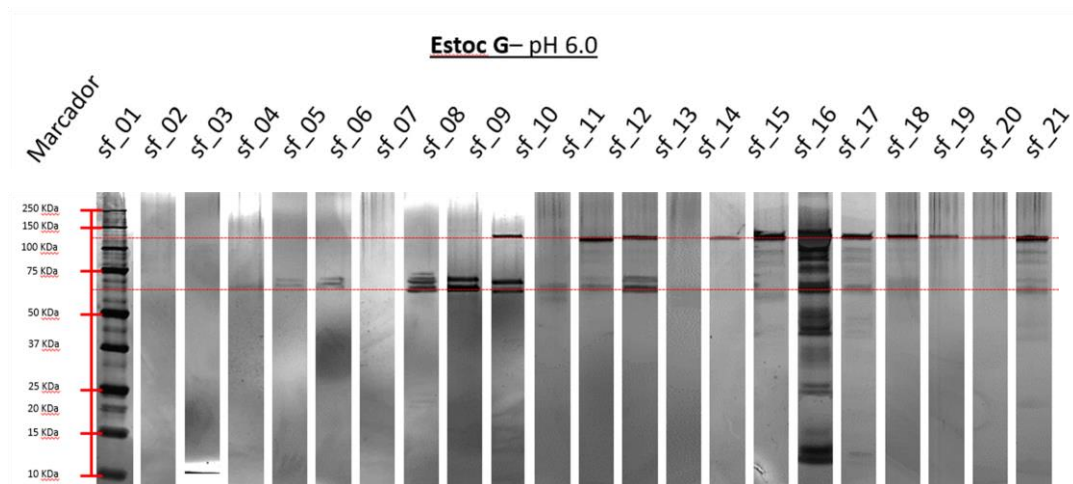


Figura 17. Compil·lació de les 21 fraccions de l'estoc G a pH 6. Es marca una guia en la proteïna majoritària, *hexon* (108 KDa) i en la proteïna penton (63 KDa).

A la fracció cf_03 no s'intuïa cap banda en el tub d'ultracentrifugació, el que s'explicaria per una concentració menor de proteïna que a la fracció cf_15. Aquesta té una densitat d'aproximadament 1.06 g/mL inferior a la de càpsides completes. Així doncs, en aquesta fracció hi pot haver proteïnes lliures i/o agregats de densitat baixa. Contràriament, a sf_03



no hi ha una concentració alta de proteïnes, fet que va en consonància amb la presència d'agregats a l'estoc G, ja que aquests si són agregats relativament grans, tindran una densitat superior.

D'altra banda, es va observar que de la fracció sf_07 a la sf_12 el patró de proteïnes de pes molecular aproximadament entre 60 i 75 KDa era diferent al de cf_07 a cf_12. Les proteïnes amb aquests pesos moleculars són: *fiber* (62 KDa), *penton* (63 KDa) i la proteïna IIIa (65 KDa). La proteïna que es perd inicialment sota una condició d'estrès és la *fiber*, ja que aquesta està més exposada. Per tant, molt probablement la banda observada en les fraccions de l'estoc F en aquesta franja de pesos moleculars sigui la *fiber*. En línia amb aquesta hipòtesi, les altres bandes observades en les fraccions de l'estoc G a un pes molecular lleugerament superior serien proteïnes estructurals que s'han desassemblat en una situació de major estrès com és el pH àcid com la *penton* i la proteïna IIIa. Les fraccions cf_10, sf_09 i sf_10 no es van considerar, ja que podia haver-se perdut proteïna si el casset estava defectuós.

4.10.3. Identificació proteica de les fraccions: nanoLC-MS/MS

Es van identificar les proteïnes i els pèptids d'algunes fraccions amb l'objectiu de conèixer quines proteïnes hi havia a cada fracció i si hi havia diferències en el perfil proteic de les fraccions de l'estoc F amb les corresponents fraccions de l'estoc G. Les fraccions analitzades van ser: de cf_01 a cf_09, cf_14, cf_15, de sf_07 a sf_09 i sf_16. Aquestes van ser prèviament digerides pel mètode FASP i dessalades.

A més de la identificació proteica, aquesta anàlisi permetria conèixer el nivell de recobriment de la seqüència de *fiber*. Aquesta és una proteïna estructural protuberant, exposada i poc protegida a diferència de la resta de proteïnes de la càpsida, però imprescindible per al procés d'infecció. L'anàlisi de la seqüència permetria identificar si aquesta es presentava a l'estoc com una proteïna lliure i completa o si pel contrari, patia una trencament en el procés de fabricació o emmagatzematge obtenint una proteïna truncada. D'aquesta manera, seria possible identificar si la pèrdua de funcionalitat era causada per la pèrdua de *fiber* o bé per el trencament d'aquesta.

Donat que les proteïnes implicades en la infecció vírica, la *penton base* i la *fiber*, tenen densitats inferior a 1.20 g/mL [Engler & Hong, 2007], aquestes es trobarien entre les fraccions 1 i 9, a no ser que estiguessin unides amb altres proteïnes formant complexes amb

una densitat diferent. Com l'objectiu principal era conèixer com està la càpsida d'Ad5 en el pH de treball, 8.5, s'analitzen les fraccions de cf_01 a cf_09. En canvi, en l'estoc estressat a pH 6 només es van analitzar les fraccions 7, 8 i 9 amb major càrrega proteica per tal de veure si existeixen diferències amb les fraccions equivalents de l'estoc a pH 8.5. *A posteriori*, es va detectar que la fracció sf_09 s'havia invalidat pel baix volum post-diàlisi. A més, es van analitzar les fraccions amb proteïna més abundant d'ambdós estocs: cf_14, cf_15 i sf_16. En l'anàlisi nanoLC-MS/MS es va identificar la presència de polímers (Figura 18). La presència d'aquests podia alterar la identificació proteica, de manera que era necessari retirar-los. La seva eliminació es va dur a terme concentrant les proteïnes mitjançant la gels d'acrilamida on la primera part del gel, conegut com a gel d'*stacking*, les apil·la eliminant els polímers. Els polímers no penetren al gel, fet que permet la seva eliminació. Tanmateix, això implica una digestió de les proteïnes en gel i una manipulació addicional de la mostra a analitzar. Aquesta manipulació podia introduir noves variables i possibles contaminacions, com és el cas de la fracció sf_07 que a l'estar contigua a la fracció cf_15 en el gel d'*stacking*, es va contaminar. Es va corroborar la contaminació per la presència de la proteïna *hexon* (P04133) a l'anàlisi amb nanoLC-MS/MS mentre que en l'anàlisi per SDS-PAGE no hi era present.

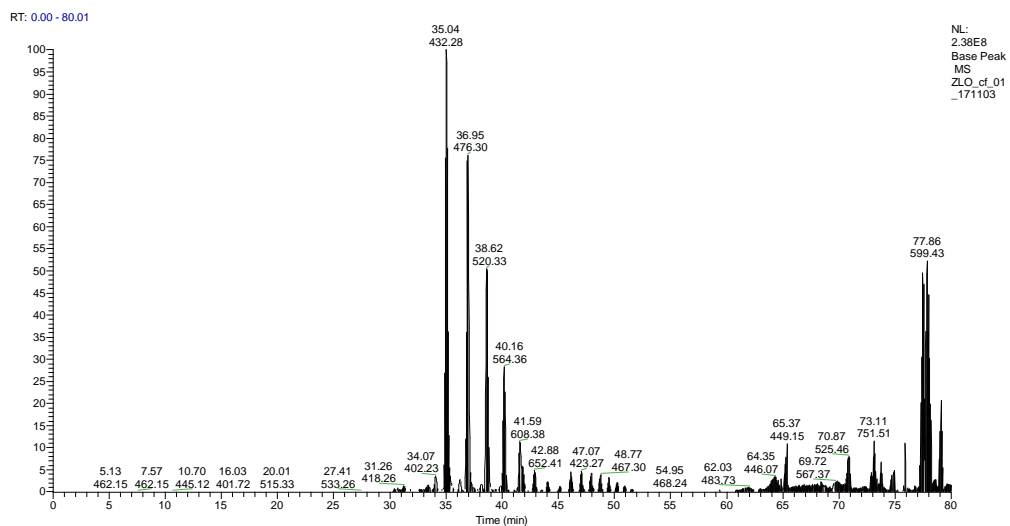


Figura 18. Exemple de l'espectre MS de la fracció cf_01 on s'observa la presència de polímer pels pics equidistants a 44 unitats aproximadament a un temps de retenció d'entre 35-45 min.

Un cop eliminats els polímers, es van analitzar les fraccions i es va identificar un total de 23 proteïnes en la base de dades de l'Ad5 (Taula 38). La representació gràfica de l'abundància de cada proteïna a cada fracció permet discernir tres grups de proteïnes de



major a menor abundància (Figura 19). El primer grup el constitueix la proteïna *hexon* (P04133), la proteïna estructural més abundant de la càpsida. El segon bloc està constituït per les proteïnes estructurals *penton* (P12538), IIIa (P12537) i *core-capsid bridging protein* (P24938). I per últim, el tercer grup amb la proteïna estructural *fiber* (P11818), proteïna únicament present als vèrtexs de la càpsida, la proteïna VI (P24937) i *pre-histone-like nucleoprotein* (P68951).

Taula 38. Llistat de les 23 proteïnes identificades en les fraccions analitzades per nanoLC-MS/MS indicant el codi d'accès de la base de dades d'Uniprot, el seu nom i pes molecular (kDa).

Codi	Descripció	Pes molecular (kDa)
P04495	DNA polymerase	120.3
P04133	<i>Hexon</i> protein	107.9
P24933	Shutoff protein	90.2
P04499	Preterminal protein	76.5
P12537	Pre- <i>hexon</i> -linking protein IIIa	65.2
P12538	<i>Penton</i> protein	63.3
P11818	<i>Fiber</i> protein	61.5
P03265	DNA-binding protein	59.1
P03243	E1B 55 kDa protein	55.0
P03271	Packaging protein 1	50.9
P04496	Packaging protein 3	47.0
P24938	Core-capsid bridging protein (VII)	41.4
P03255	Early E1A protein	31.8
P24937	Pre-protein VI	27.0
P24940	Protein 33K	25.1
P24936	Pre- <i>hexon</i> -linking protein VIII	24.7
P03253	Protease	23.1
P68951	Pre-histone-like nucleoprotein	22.0
P03281	<i>Hexon</i> -interlacing protein (IX)	14.4
Q2KS10	Pre-core protein X	8.8
Q2KS19	I-leader protein	16.1
P04489	Probable early E4 11 kDa protein	13.3
P03255	Early E1A protein	31.8



	cf01	cf02	cf03	cf04	cf05	cf06	cf07	cf08	cf09	cf14	cf15	sf07	sf08	sf09	sf16
A8W995															
P03243															
P03246															
P03253															
P03255															
P03265															
P03271											438	440	511		
P03281															
P04133			704						831	891	2980	2728	2784	2220	1956
P04489															
P04493															
P04495															
P04496											438	438	438		438
P04499															
P06496															
P06497															
P11818			418								304	400	480	268	
P12537			438						480	480	732	648	516	448	644
P12538									480	480	396	456	832	612	
P24933															
P24936															
P24937											368	360	792		
P24938			438						480	480	772	876	780	368	856
P24940															
P68951											384	344	400	368	528
Q2K503															
Q2K510															
Q2K519															

Figura 19. Representació gràfica de l'abundància de cada proteïna a cada fracció segons el nombre de PSM resultants de l'anàlisi amb LC-MS/MS. Les dades de cada fracció es van normalitzar atenent el volum de mostra analitzat.

Com es pot veure a la Figura 19, el perfil proteic de les fraccions principals cf_15 i sf_16 de cada estoc difereix, ja que cf_15 presenta una concentració més alta d'algunes proteïnes com *penton* (P04133), necessària per a la infecció, i la proteïna VI (P24937), proteïna estructural. La proteïna *penton* i la proteïna VI estan situades al vèrtex del virió. La baixa concentració d'aquestes proteïnes a sf_16 indica que una gran part d'aquestes es van desassemblar de la càpsida i per tant, la fracció principal de l'estoc G estava constituïda per càpsides d'Ad5 incompletes, com a mínim parcialment desestructurades. Així doncs, un pH de 6 altera l'estabilitat de l'Ad5 fent que aquestes s'alliberin del vèrtex. Aquesta diferència entre la fracció principal de l'estoc control i estressat no es va observar en la proteïna *fiber*, ja que

aquesta és una proteïna poc abundant a la càpsida i per tant, no quedarà refelectit a l'escala d'abundància establerta. Així doncs, l'estoc a pH 8.5 presentava una fracció cf_15 amb una major quantitat de càpsides completes que no havien perdut la proteïna *penton*, mentre que la fracció sf_16 en va perdre una gran quantitat. La pèrdua de *penton* causa una disminució en la funcionalitat de l'Ad5, ja que no estaran disponibles els 12 vèrtexs d'unió a la cèl·lula i es reduirà la probabilitat d'infecció.

D'altra banda, es va poder observar que la fracció sf_08 tenia una concentració més alta de la majoria de proteïnes en comparació a cf_08. Aquest fenomen es pot explicar pel fet que en l'estoc G un pH de 6 ha causat la desestructuració de la càpsida i l'alliberació de proteïnes. De manera que les proteïnes alliberades de forma lliure o associades a altres proteïnes es van situar a la densitat corresponent fent que el perfil de distribució diferís de l'estoc F a pH 8.5.

En quant a cf_03, va presentar un perfil proteic molt similar a cf_15, però en menor abundància. Tenint en compte que la fracció cf_03 tenia una densitat baixa, probablement fossin proteïnes lliures de càpsides parcial o totalment desmantellades a causa d'una desestabilització durant l'emmagatzematge a -80°C. Durant desenvolupament galènic de la formulació ja s'havia confirmat que la composició d'aquest estoc F sense albúmina no era suficient per a estabilitzar l'Ad5 i l'emmagatzematge a -80°C causava pèrdues de funcionalitat.

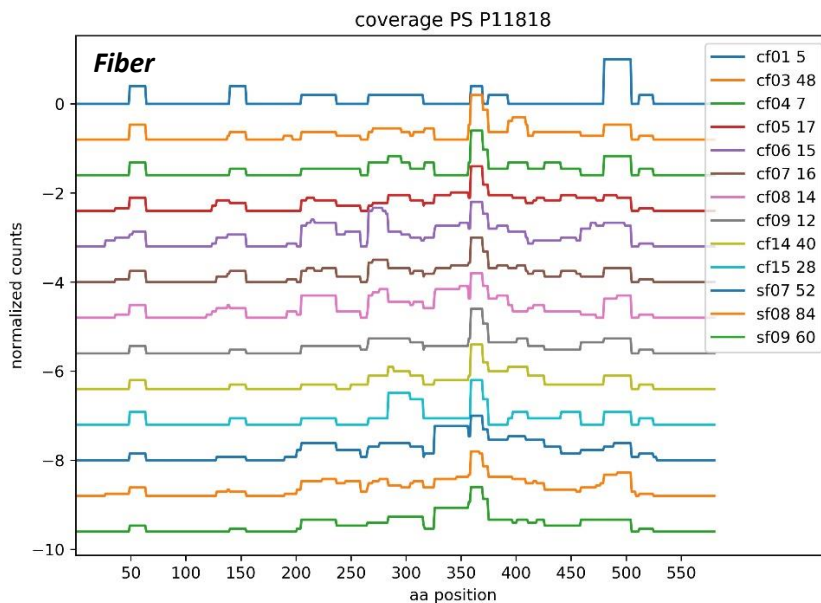


Figura 20. Representació gràfica del recobriments de la seqüència de la proteïna *fiber* en cada una de les fraccions analitzades per LC-MS/MS segons el nombre de PSM resultants. Les dades de cada fracció s'han normalitzat segons el volum analitzat i el valor màxim de PSM.



Paral·lelament, es va analitzar el recobriment de la seqüència de *fiber* amb els pèptids identificats per l'anàlisi nanoLC-MS/MS. No es van observar diferències en el perfil de recobriment de les diferents fraccions, tret d'aquelles en les que la proteïna *fiber* era poc abundant. Això va descartar la possibilitat de que *fiber* experimentés un trencament en el procés de fabricació i emmagatzematge estàndard. De manera que la pèrdua de funcionalitat no era causada pel truncament de la proteïna *fiber*, sinó per una pèrdua parcial dels vèrtexs (Figura 20).

4.10.4. TEM de l'Ad5

Amb les imatges de TEM es va comprovar el nivell d'agregació i l'estat de les càpsides d'un estoc amb la formulació candidata a pH 8.5 i 6, és a dir, en presència d'albumina. L'anàlisi es va fer amb un estoc amb la formulació candidata per a conèixer l'estat d'agregació de les càpsides així com la geometria dels agregats. Es va analitzar també el mateix estoc a pH 6 per tal de corroborar que aquest pH causava un increment en l'agregació i una desestabilització de les càpsides d'Ad5, fenomen ja observat en l'anàlisi SDS-PAGE i nanoLC-MS/MS. Simultàniament, es va analitzar una mostra d'ARM per a conèixer el comportament del l'Ad5 de referència amb una formulació senzilla que conté glicerol.

A la figura 21 de l'ARM es pot veure que les càpsides estaven intactes i la majoria d'elles no estaven agregades. Els agregats presents són dímers amb una mida d'aproximadament 200 nm. A més, es pot identificar la proteïna *fiber* que irradia dels vèrtexs de la càpsida. En canvi, a l'estoc a pH 8.5 hi havia un nivell d'agregació superior al de l'ARM, ja que la presència de dímers i trímers és major. La presència de dímers i trímers amb una mida d'entre 200-300 nm va corroborar la hipòtesi realitzada en l'estabilitat de 2 h del liofilitzat reconstituït en que augmentava la mida de partícula per l'agregació de 2 o 3 càpsides que segons la geometria tindria una mida entre 200-300 nm. La majoria de càpsides estaven intactes (Figura 22), però també se'n van observar en procés inicial de desmantellament amb punts de disrupció als vèrtexs. Aquesta desestabilització de la càpsida d'Ad5 implica una menor protecció en solució que en el tampó de l'Ad5 de referència tot i la presència d'albumina. A més, en l'estoc a pH 8.5 no va ser possible discernir la proteïna *fiber*. Es desconeix si el motiu és perquè no estava unida a la càpsida i es van perdre la majoria de càpsides o si bé, no es va aconseguir la suficient resolució a la imatge pel fons granulós i difús creat per l'alta concentració d'excipients de la formulació i les proteïnes lliures. Cal tenir en compte que es desconeix si el procés de tinció negativa utilitzat interferia en

l'estabilitat d'Ad5. En les imatges d'ARM no es distingeixen totes les proteïnes *fiber*, només algunes.

D'altra banda, es va observar que la disminució de pH incrementat el nivell d'agregació formant agregats de múltiples càpsides i multiplicant l'efecte desestabilitzant, ja que totes les càpsides estan en un procés avançat de desmantellament (Figura 23).

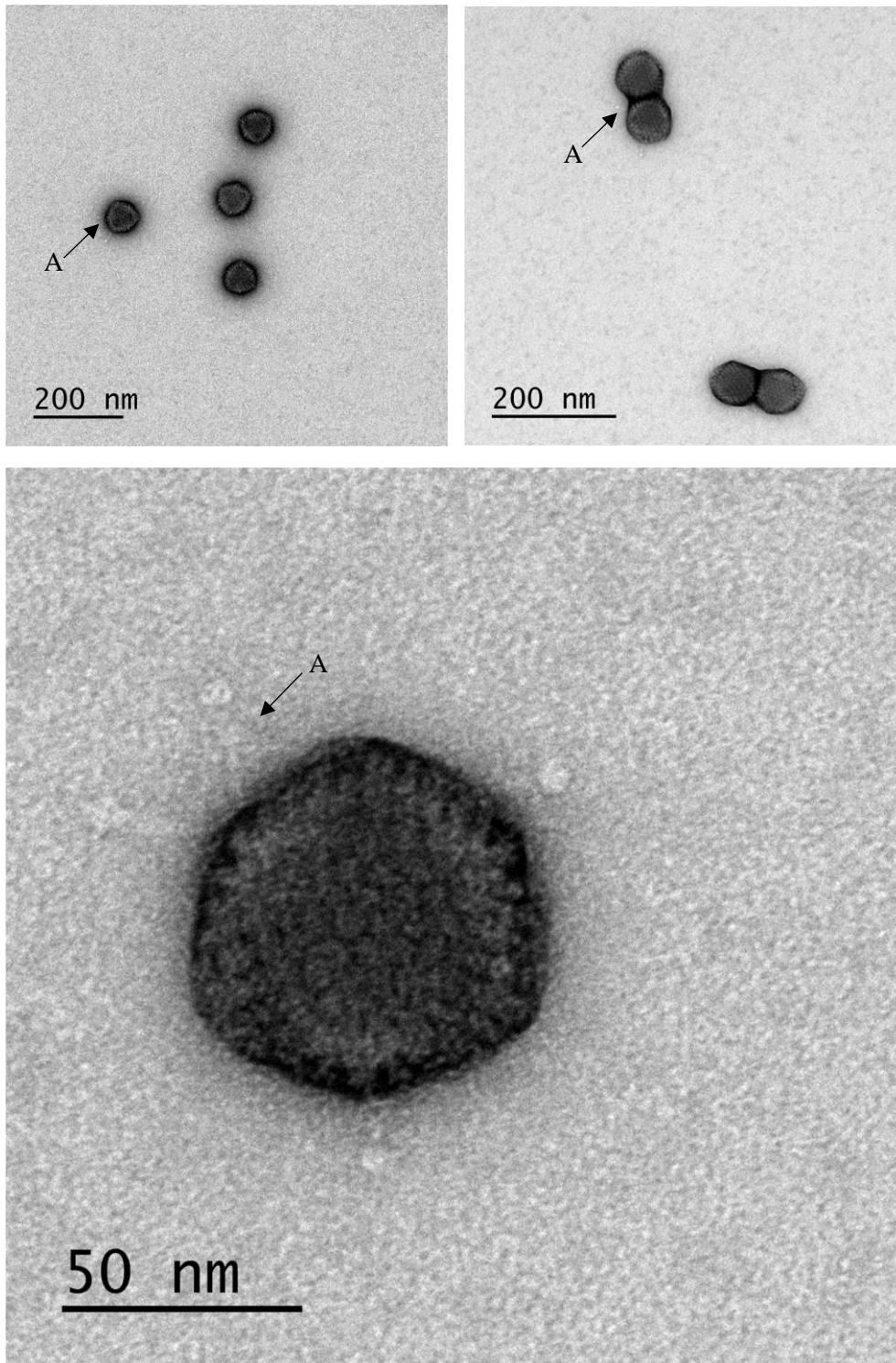


Figura 21. TEM de l'ARM amb tinció negativa amb un 2% d'acetat d'uranil a temperatura ambient. S'indica la proteïna *fiber* (A).

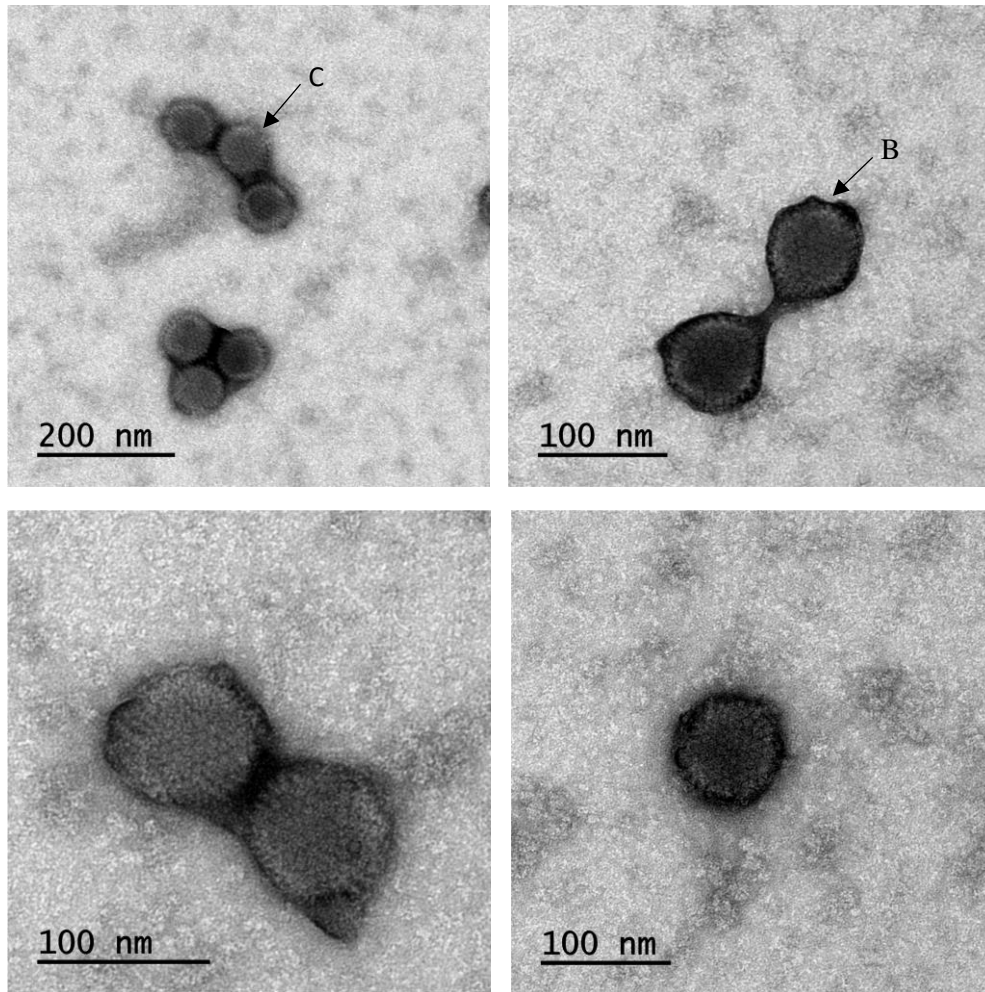


Figura 22. TEM de l'estoc amb formulació candidata a pH 8.5 amb tinció negativa amb un 2% d'acetat d'urani a temperatura ambient. S'indica un exemple de càpsida intacta sense obertura (B) i càpsida amb vèrtex compromès (C).

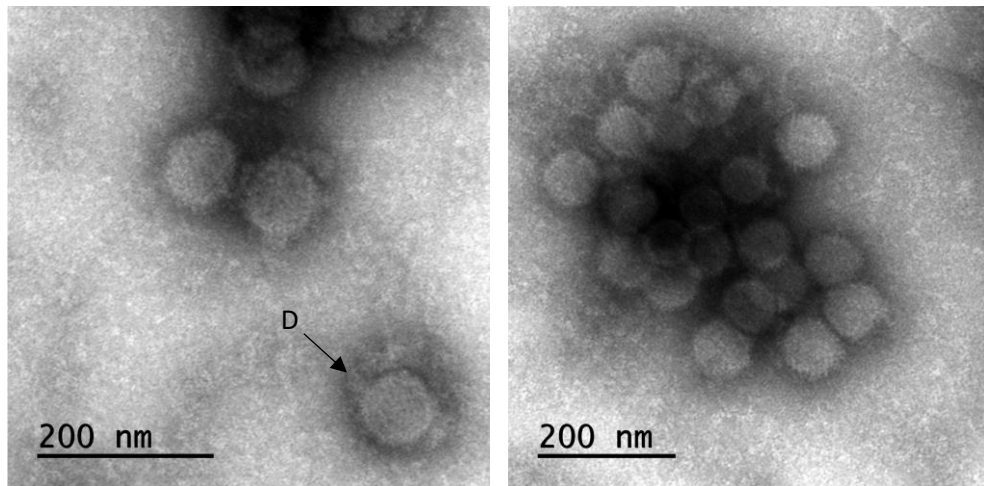


Figura 23. TEM de l'estoc amb formulació candidata a pH 6 amb tinció negativa amb un 2% d'acetat d'uranil a temperatura ambient. S'indica un exemple de una càpsida en un procés avançat de desmantellament (D).

5. CONCLUSIONS



Les conclusions del projecte dut a terme s'exposen a continuació:

- La formulació candidata té una composició d'excipients adequada en termes de tonicitat, qualitat i acceptabilitat amb l'administració parenteral evitant l'ús del glicerol.
- El liofilitzat obtingut té una aparença adequada amb una estructura elegant i uniforme que permet una bona reconstitució.
- El sistema proposat ha permès conferir una protecció adequada en estat líquid i sòlid, garantint la robustesa necessària per al procés complet de fabricació i l'escalat industrial.
- Tot i que l'estat actual de l'estudi d'estabilitat a llarg termini no permet extrapol·lar la vida útil del producte, la perspectiva és bona, ja que la selecció adequada d'excipients i la optimització parcial del cicle de liofilització ha permès obviar l'estrès creat per la liofilització i obtenir resultats equiparables als reportats a la literatura. La pèrdua de funcionalitat en la liofilització és mínima mantinguda fins al punt actual d'estabilitat de 3 mesos a 5°C i -20°C.
- L'aproximació galènica que s'ha dut a terme ha permès identificar el pH, l'agregació i la humitat com els atributs crítics d'una formulació liofilitzada a una concentració vírica de 1E12 pv/mL.

6. BIBLIOGRAFIA

Allison SD, Dong A, Carpenter JF. 1996. Counteracting effects of thiocyanate and sucrose on Chymotrypsinogen secondary structure and aggregation during freezing, drying and rehydration. *Biophys J* 71:2022-2032.

Allison SD, Randolph TW, Manning MC, Middleton K, Dalis A, Carpenter JF. 1998. Effects of drying methods and additives on structure and function of actin: mechanisms of dehydration-induced damage and its inhibition. *Arch Biochem Biophys* 358: 171-181.

Allison SD, Randolph TW, Cheng BS, Carpenter JF. 1999. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibiting dehydration-induced protein unfolding. *Arch Biochem Biophys* 365: 289-298.

Altaras NE, Aunins JG, Evans RK, Kamen A, Kunz JO, Wolf JJ. 2005. Production and formulation of Adenovirus vectors. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 99: 193-260.

Anchordoquy TJ, Carpenter JF. 1996. Polymers protect lactate dehydrogenase during freeze-drying by inhibiting dissociation in the frozen state. *Arch Biochem Biophys*. 332: 231-238.

Arakawa T, Timasheff SN. 1982. Preferential interactions of proteins with salts in concentrated solutions. *Biochemistry* 21: 6545-6552.

Arakawa T, Kira Y, Carpenter JF. 1991. Protein solvent interactions. *Pharm Res* 8: 285-291.

Arakawa T, Prestrelski SJ, Kenney WC, Carpenter JF. 1993. Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. *Adv Drug Deliv Rev* 10: 1-28.

Barclay T, Ginic-Markovic M, Cooper P, Petrovsky N. 2010. Inulin: A versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *J Excip Food Chem*, 1: 27-50.

Bell LN, Hagemak MJ, Bauer JM. 1995. Impact of moisture on thermally induced demonstration and decomposition of lyophilized bovine somatotropin. *Biopolymers* 35: 201-209.

Bhat R, Timasheff SN. 1992. Steric exclusion is the principal source of the preferential hydration of proteins in the presence of polyethylene glycols. *Prot Sci* 1: 1133-1143.

Blanche F, Shih S-J. 2000. Composition for the preservation of infections recombinant adenoviruses. PCT Int Appl WO 00/61726.

Blanche F, Cameron B, Somarriba S, Maton L, Barbot A, Guillemin T. 2001. Stabilization of recombinant adenovirus: Site-directed mutagenesis of key asparagine residues in the *hexon* protein. Anal Biochem 297: 1-7.

Bosch F, Roca C, Anguela X, Ruzo A. 2010. Gene Therapy, a new tool to cure human diseases. CBATEG-UAB. Disponible a :

<https://www.youtube.com/watch?v=U3RygvuSrok>

Boudin ML, Boulanger P. 1982. Assembly of adenovirus *penton base* and *fiber*. Virology 116: 589-604.

Boulanger P, Lenoy P, Blair GE, Russell WC. 1979. Characterization of adenovirus protein IX. J Gen Virol 44: 783-800.

Booy MP, de Ruiter RA. 1992. Evaluation of the physical stability of freeze-dried sucrose-containing formulations by differential scanning calorimetry. Pharm Res 9: 109-114.

Carpenter JF, Crowe LM, Crowe JH. 1987. Stabilization of phosphofructokinase with sugars during freeze-drying: characterization of enhanced protection in the presence of divalent cations. Biochem Biophys Acta 923: 109-115.

Carpenter JF, Crowe JH. 1989. An infrared spectroscopic study of the interactions of carbohydrates with dried proteins. Biochemistry 28: 3916-3922.

Carpenter JF, Crowe JH, Arakawa T. 1990. Comparison of solute-induced protein stabilization in aqueous solution and in frozen and dried state. J Dairy Sci 73: 3627-3636.

Carpenter JF, Arakawa T, Crowe JH. 1991. Interactions of stabilizing additives with proteins during freeze-thawing and freeze-drying. Dev Biol Stand 74: 225-239.

Carpenter JF, Pikal MJ, Chan BS, Randolph TW. 1997. Rational design of stable lyophilized protein formulations: Some practical advice. Pharm Res 14: 969-975.

Carpenter JF, Chand BS, Garzon-Rodriguez W, Randolph TW. 2002. Rational Design of Stable lyophilized protein formulations: theory and practice. Pharm Biotechnol 13: 109 -133.

Casto BC, Hammon WH. 1996. Conditions affecting the stability of a simian adenovirus in the presence of magnesium chloride. *P Soc Exp Biol Med* 122: 1216-1219.

Chaillot B, Labrude C, Vigneron C, Simatos D. 1981. Freeze-drying of hemoglobin solutions without adjuvant and in presence of glucose, Tris, and beta-alanine: A study by electron spin resonance of the oxidized compounds produced. *Am J Hematol* 10: 319-326.

Challener CA. 2015. Excipient Selection for protein Stabilization. *Pharm Technol* 39: 35-39.

Chang BS, Randall CS. 1992. Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization. *Cryobiology* 29: 632-656.

Chang BS, Kendrick BS, Carpenter JF. 1996. Surface-Induced Denaturation of proteins During freezing and its inhibition by surfactants. *J Pharm Sci* 85: 1325-1330.

Chang BS, Beauvais RM, Carpenter F. 1996a. Physical factors affecting the storage stability of freeze-dried interleukin- I receptor antagonist: Glass Transition and protein conformation. *Arch Biochem Biophys*. 331(2): 249-258.

Chang BS, Kendrick BS, Carpenter JF. 1996b. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *J Pharm Sci* 85(12): 1325-1330.

Chang BS, Reeder G, Carpenter JF. 1996c. Development of a stable freeze-dried formulation of recombinant human interleukin - I receptor antagonist. *Pharm Res* 13: 243-249.

Chang BS, Patro SY. 2004. Freeze-drying process development for protein pharmaceuticals, a *Lyophilization of Biopharmaceuticals* (Constantino HR, Pikal MJ eds). pp 113-138.

Changahun C, Xiaoyan D, Xiaobing W, Boyun W, Gang J, Lingpeng C, Hongrong L. 2012. Conserved *fiber-penton base* interaction revealed by nearly atomic resolution cryo-electron microscopy of the structure of adenovirus provides insight into receptor interaction. *J Virol* 86: 12322-12329.

Chillón M, Bosch A (eds). 2014. Adenovirus: methods and protocols. *Methods Mol Biol* vol 1089.

Cleland JL, Powell MF, Shire SJ. 1993. The Development of stable protein formulations: a close look at protein aggregation, deamidation and oxidation. *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst* 10: 307-377.

Colby WW, Shenk T. 1981. Adenovirus type 5 virions can be assembled *in vivo* in the absence of detectable polypeptide IX. *J Virol* 39: 977-980.

Corveleyna S, De Smedtb S, Remon JP. 1997. Moisture absorption and desorption of different rubber lyophilization closures. *Int J Pharm* 159, 57-65.

Crowe JH, Hoekstra FA, Crowe LM. 1992. Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 54: 579-599.

Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF. 1993. Preserving dry biomaterials: the water replacement hypothesis. *Biopharm* 6: 40-43.

Crowe LM, Reid DS, Crowe JH. 1996. Is trehalose special for preserving dry biomaterials? *Biophys J* 71: 2087-2093.

Crowe JH, Carpenter JF, Crowe LM. 1998. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* 60: 73-103.

Croyle MA, Roessler BJ, Davidson BL, Hilfinger JM, Amidon GL. 1998. Factors that influence the stability of recombinant adenoviral preparations for human gene therapy. *Pharm Dev Technol* 3: 373:383.

Croyle MA, Cheng X, Wilson JM. 2001. Development of formulations that enhance physical stability of viral vectors for gene therapy. *Gene Ther* 8: 1281-1290.

Cruz PE, Silva AC, Roldao A, Carmo M, Carrondo MJT, Alves PM. 2006. Screening of Novel Excipients for improving the stability of retroviral and adenoviral vectors. *Biotechnol Prog* 22: 568-576.

Evans RK, Navrocki DK, Isopi LA, Williams DM, Casimiro DR, Chin S, Chen M, Zhu DM, Shiver JW, Volkin DB. 2004. Development of stable liquid formulations for Adenovirus based vaccines. *J Pharm Sci* 93: 2458-2475.

FDA. 2000. Adenovirus titer measurements and RCA levels. BRMAC Meeting 30.

FDA. 1993. Guide to inspections of lyophilization of parenterals.

Ford A, Dawson PJ. 1994. Effect of type of container; storage temperature and humidity on the biological activity of freeze-dried alkaline phosphatase. *Biologicals* 22: 191-197.

Frei A, Kwan HKH, Sandweiss VE, Vellekamp GJ, Yuen P-H, Bondoc LL, Porter FWP, Tang JC-T, Inhat P. 2003. Compositions comprising viruses and methods for concentrating virus preparations. US Patent Appl 0157066 A1.

Fechner H, Haack A, Wang H, Wang X, Tizema K, Pauschinger M, Schoemaker R, Veghel R, Houtsmuller A. 1999. Expression of Coxsackie adenovirus receptor and alpha_v-integrin does not correlate with adenovector targeting *in vivo* indicating anatomical barrier vectors. *Gen Ther* 6: 1520-1535

Galdiero F. 1979. Adenovirus aggregation and preservation in extracellular environment. *Arch Virol* 59: 99-105.

Ghebremedhin B. 2014. Human adenovirus: viral pathogen with increasing importance. *Eur J Microbiol Immunol* 4: 26-33.

Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A. 1993. Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* 75: 477-486.

Greiff D. 1970. Stabilities of suspensions of influenza **virus** dried by sublimation of ice in vacuo to different gases. *Appl Microbiol* 20(6): 935-938.

Hannan C, Raptis L, Déry CV, Weber J. 1983. Biological and structural studies with an Adenovirus type 2 temperature-sensitive mutant defective for uncoating. *Intervirology* 19: 213-223.

Hansen LJJ, Daoussi R, Vervaet C, Remon J-P, De Beer TRM. 2015. Freeze-drying of live virus vaccines: A review. *Vaccine* 33: 5507-5519.

Hatley RH, Franks F. 1991. Applications of DSC in the development of improved freeze-drying processes for labile biological. *J Therm Anal* 37: 1905-1914.

Hatley RHM, Franks F, Brown S, Sandhu G, Grey M. 1996. Stabilization of a pharmaceutical drug substance by freeze-drying: a case study. *Drug Stability* 1: 2-12.

Hoganson DK, MA JC, Asato L, Ong M, Printz MA, Huyghe BG, Sosnowski BA, D'Andrea MJ. 2002. Development of stable adenoviral vector formulation. *Bioprocessing: Tech Dev Opp* 1: 43-48.

Hoffman K. 2000. Strategies for host cell protein analysis. *Bio Techniques* 13: 38-45.

Honkavuori KS, Pollard BD, Rodriguez MS, Hay RT, Kemp GD. 2004. Dual role of the adenovirus pVI C terminus as a nuclear localization signal and activator of the viral protease. *J Gen Virol* 85: 3367-3376.

Hutchins B, Sajjadi N, Seaver S, Sheperd A, Bauer SR, Simek S, Carson K, Aguilar-Cordova E. 2000. Working toward an adenoviral vector testing standard. *Mol Ther* 2: 532-534.

Hutchins B, Hopkins J. 2002. Development of a reference material for characterizing adenovirus vectors. *Bioprocess J* 1: 125-128.

International Conference on Harmonization. 1994. ICH Q2A: Validation of Analytical Procedures: Methodology.

International Conference on Harmonization. 1996. ICH Q2B: Validation of Analytical Procedures: Terms and Definitions.

International Conference on Harmonization, 2003. ICH Q1A (R2). Stability Testing of New Drug Substances and Products.

Imperiale MJ. 2008. Keeping Adenovirus away from the liver. *Cell Host Microbe* 3: 119-120.

Jakubczak JL, Rollence ML, Stewart DA, Jafari JD, Von Seggern DJ, Nemerow GR, Stevenson SC, Hallenbeck PL. 2011. Adenovirus type 5 viral particles pseudotyped with mutagenized *fiber* proteins show diminished infectivity of Coxsackie B-Adenovirus receptor-bearing cells. *J Virol* 75: 2972-2981.

Johnson RE, Kirchhoff CP, Gand HT. 2002. Mannitol-sucrose mixtures: Versatile formulations for protein lyophilization. *J Pharm Sci* 91: 914-922.

Juuma M, Muller BW. 1999. *In vitro* investigation of the effect of various isotonic substances in parenteral emulsions on human erythrocytes. *Eur J Pharm Sci* 9: 207-212.

Kreilgaard L, Frokjaer S, Flink JM, Randolph TW, Carpenter JF. 1999. Effects of additives on the stability of Humicola lanuginosa lipase during freeze-drying and storage in the dried solid. *J Pharm Sci* 88: 281-290.

Lam XM, Constantino HR, Overshiever DE, Nguyen TH, Hsu CC. 1996. Replacing succinate with glycolate buffer improves the stability of lyophilized interferon-gamma. *Int J Pharm* 142: 85-95.

Lang R, Winter G. 2009. Rational Design of a stable, freeze-dried virus-like particles-based vaccine formulation. *Drug Dev Ind Pharm* 35: 83-97.

Le LP, Everts M, Dmitriev IP, Davydova JG, Yamamoto M, Curiel DT. 2004. Fluorescently labeled adenovirus with pIX-EGFP for vector detection. *Mol Imaging* 3: 105-116.

Lee TW, Blair GE, Mathews DA. 2003. Adenovirus core protein VII contains distinct sequences that mediate targeting to the nucleus and nucleolus, and colocalization with human chromosomes. *J Gen Virol* 84: 3423-3428.

Lee TW, Lawrence FJ, Danksaite V, Akusjarvi G, Blair GE, Mathews DA. 2004. Precursor of human adenovirus core polypeptide Mu targets the nucleolus and modulates the expression of E2 proteins. *J Gen Virol* 85: 185-196.

Li E, Stupeck D, Bokoch GM, Nemerow GR. 1998. Adenovirus endocytosis requires actin cytoskeleton reorganization mediated by Rho family GTPases. *J Virol* 72: 8806-8812.

Li S, Schoneich C, Borchardt RT. 1995. Chemical instability of protein pharmaceuticals: mechanisms of oxidation and strategies for stabilization. *Bioengineered* 48: 431-500.

Li S, Patapoff TW, Overshiever D, Hsu C, Nguyen TH, Borchardt RT. 1996. Effects of reducing sugars on the chemical stability of human relaxin in the lyophilized state. *J Pharm Sci* 85: 873-877.

Liu GO, Babiss LE, Volkert FC, Young CS, Grisberg HS. 1985. A thermolabile mutant of adenovirus 5 resulting from a substitution mutation in the protein VIII gene. *J Virol* 53: 920-925.

Liu H, Jin L, Koh SBS, Atanasov I, Schen SS, Wu L, Shou ZH. 2010. Atomic Structure of human adenovirus by cryoEM reveals interactions among protein networks. *Science* 329: 1038-1043.

Liu H, Wu L, Zhon ZH. 2011. Model of trimeric *fiber* and its interactions with the pentameric *penton base* of human adenovirus by cyo-electron microscopy. *J Mol Biol* 406: 764-774.

Maheshwari G, Jannat RM, McCormick L, Hsu D. 2004. Thermal inactivation of adenovirus type 5. *J Virol Methods* 118: 141-146.

Maizel JV, White DO, Scharff MD. 1968. The polypeptides of adenovirus. I. Evidence for multiple protein components in the virus and comparison of types 2, 7A and 12. *Virology* 36: 115-125.

Martin-Fernandez M, Longshaw SV, Kirby I, Santis G, Tobin MJ, Clarke DT, Jones GR. 2004. Adenovirus type-5 entry and disassembly followed in living cells by FRET, fluorescence anisotropy and FLIM. *Biophys. J* 87: 1316-1327.

Melnick JL, Wallis C. 1963. Effect of pH on the thermal stabilization of oral poliovirus vaccine by magnesium chloride. *Proc Soc Exp Biol Med* 112: 894-897.

Meulenbroek RA, Sargent KL, Lunde J, Jasmin BJ, Parks RJ. 2004. Use of adenovirus protein IX (pIX) to display large polypeptides on the vision-generation of fluorescent virus thought the incorporation of the pIX-GFP. *Mol Ther* 9: 617-624.

Nakano MY, Boucke K, Suomalainen M, Stidwill RP, Greber UF. 2000. The first step of adenovirus type 2 disassembly occurs at the cell surface, independently of endocytosis and escape of the cytosol. *J ViroL* 74: 7085-7095.

Nemenow GR, Stewart PL, Reddy VS. 2012. Structure of Human Adenovirus. *Curr Opin Virol* 2: 115-121.

Nyberg-Hoffman C, Shabram P, Li W, Giroux D, Aguilar-Cordova E. 1997. Sensitivity and reproducibility in adenoviral infectious titer determination. *Nat Med* 3: 808-811.

Nyberg-Hoffman C, Aguilar-Cordova E. 1999. Instability of adenoviral vectors during transport and its implication for clinical studies. *Nat Med* 5: 955-957.

Ohtake S, Kita Y, Arakawa T. 2011. Interactions of formulation excipients with proteins in solution and in the dried state. *Adv Drug Deliv Rev* 63: 1053-1073.

Ostapchuk P, Yang J, Auffarth E, Hearing P. 2005. Functional interaction of the adenovirus IVa2 protein with adenovirus type 5 packaging sequences. *J Virol* 79: 2831-2838.

Ostapchuk P, Almond M, Hearing P. 2011. Characterization of empty Adenovirus particles assembled in the absence of a functional adenovirus IVa2 protein. *J Virol* 85(11): 5524-5531.

Peetermans J. 1996. Factors affecting the stability of viral vaccines. *Dev Biol Stand* 87: 97-101.

Pikal MJ, Shah S, Roy ML, Putman R. 1990. The secondary drying state of freeze-drying: Drying kinetics as a function of temperature and chamber pressure. *Int J Pharm* 60: 203-207.

Pikal MJ, Dellemon KM, Roy ML, Riggio RM. 1991. The effects of formulation variable on the stability of freeze-dried human growth hormone. *Pharm Res* 8: 427-437.

Pikal MJ. 1991a. Freeze-drying of proteins, part I: Process Design. *Pharm Technol Int* pp 37-43.

Pikal MJ, Shah S. 1992. Moisture transfer from stopper to product and resulting stability implications. *Dev Biol Stand* 74: 165-177.

Pikal MJ. 1993. Freeze drying of proteins, part II: formulation selection. *Biopharm* 3: 26-30.

Pikal MJ. 1999. Mechanisms of protein stabilization during freeze-drying and storage: The relative importance of thermodynamic stabilization and glassy state relaxation dynamics. *A Freeze-drying/ Lyophilization of Pharmaceuticals and Biological Products*, 96: 161-198.

Pramanick S, Singodia D, Chandal V. 2013. Excipient selection in parenteral formulation development. *Pharma Times* 5: 65-77.

- Prestreslski S, Tedeschi N, Arakawa T, Carpenter JF. 1993. Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J* 65: 661-671.
- Reich I, Schnaare R. 1995. Tonicity, osmoticity, osmolality and osmolarity. 613:627.
- Rexroad J, Wiethoff CM, Green AP, Kierstead TD, Scott MO, Middaugh CR. 2003. Structural stability of adenovirus type 5. *J Pharm Sci* 92: 665-678.
- Rexroad J, Evans RK, Middaugh R. 2005. Effect of pH and ionic strength on the physical stability of adenovirus type 5. *J Pharm Sci* 95: 237-247.
- Rexroad J, Martin TT, McNeilly D, Godwin S, Middaugh CR. 2006. Thermal stability of Adenovirus type 2 as a function of pH. *J Pharm Sci* 95: 1469-1479.
- Roberts CJ. 2014. Therapeutic protein aggregation: mechanisms, design and control. *Trends Biotechnol* 32: 372-380.
- Rodríguez LT, Lecot J, Padilla AP, Campderrós ME, Zaritzky NE. 2013. Calorimetric study of inulin as cryo- and lyoprotector of bovine plasma proteins. *A Applications of Calorimetry in a Wide Context - Differential Scanning Calorimetry, Isothermal Titration Calorimetry and Microcalorimetry*. Pp 197-218.
- Russell WC, Valentine RC, Pereira HG. 1967. The effect of heat on the anatomy of the adenovirus. *J Gen Virol* 1: 509-522.
- Russell WC. 2009. Adenoviruses: update on structure and function. *J Gen Virol* 90: 1-20.
- Rux JJ, Burnett Rm. 1999. Type-Specific locations revealed by x-ray crystallographic study of adenovirus tupe 5 *hexon*. *Mol Ther* 1: 18-30.
- Sene C. 1998. Method for preserving infections recombinant viruses, aqueous viral suspension and use as medicine. PCT Int Appl WO 98/02522.
- Shayakhmetov D, Eberly AM, Li Z-Y, Lieber A. 2005. Deletion of *penton* RGD motifs affects the efficiency of both the internalization and the endosome escape of viral particles containing serotype 5 or 35 *fiber* knobs. *J Virol* 79: 1053-1061.

Shih S-J, Mcglennon KR, Moody D. 2000. Adenovirus formulations for gene therapy. PCT Int Appl WO 00/09675.

Singh SK, Afonina N, award M, Bechtold, Peters K, Blue JT, Chou D, Cromwell M. 2010. An industry perspective on the monitoring of subvisible particles as a quality attribute for protein therapeutics. J Pharm Sci 99: 3302-3321.

Smith GJ, Helf M, Nesbet C, Ferre F. 1999. Fast and accurate method for quantitating E. coli host-cell DNA contamination in plasmid DNA preparations. BioTechniques 26: 518-526.

Sprunck G, Wigand R. 1981. Stabilization of adenovirus infectivity against thermoinactivation by lowered ionic strength. Med Microbiol Immunol 170: 37-43.

Stanton J, Tancher-Scholz G, Schneider M, Heilmann J, Kraft G. 1993. Protection of DNA from high LET radiation by two OH radical scavengers. Tris (hydroxymethyl) aminomethane and 2-mercaptoethanol. Radiat Environ Biophys. 32: 21-32.

Stewart PL, Burnett RM, Cyrklaff M, Fuller SD. 1991. Image reconstruction reveals the complex molecular organization of adenovirus. Cell 67: 145-154.

Stewart PL, Fuller SD, Burnett RM. 1993. Difference imaging of adenovirus: bridging the resolution gap between x-ray crystallography and electron microscopy. EMBO J 12: 258-2599.

Stewart PL, Burnett RM. 1995. Adenovirus structure by X-ray crystallography and electron microscopy. A *The Molecular Repertoire of Adenovirus I. Vision structure and lufection*. pp 25-28.

Strickley RG, Anderson BD. 1996. Solid-state stability of human insulin I. Mechanism and the effect of water on the kinetics of degradation in lyophiles from pH 2-5 solutions. Pharm Res 13: 1142-1153.

Sun WCE. 1997. Temperature and viscosity for structural collapse and crystallization of amorphous carbohydrate solutions. Cryo-letters 18: 99-106.

Tanaka T, Takeda T, Miyahama R. 1991. Cryoprotective effect of saccharides on denaturation of catalase during freeze-drying. Chem Pharm Bull 39(5): 1091-1094.

Tarelli E, Mire-Sluis A, Tivman HA, Bolgiano B, Crane DDT, Gee C, Lemercinier X, Athayde ML, Sataliffe N, Corran PH, Rafferty B. 1998. Recombinant human albumin as a stabilizer for biological material and for the preparation of international reference reagents. *Biologicals* 26: 331-346.

Teschke CM, McGough A, Thuman-Commike PA. 2003. *Penton* release from P22 heat-expanded capsids suggests importance of stabilizing *penton-hexon* interactions during capsid maturation. *Biophys J* 84: 2585-2592.

Timasheff SN, 1993. The control of protein stability and association by weak interactions with water: how do solvents affect these processes? *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 22: 67-97.

Timasheff SN. 1998. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: The simplicity of the complicated. *Adv Prot Chem* 51: 355-432.

Timasheff SN. 2002. Protein-solvent preferential interactions, protein hydration, and the modulation of biochemical reactions by solvent components. *PNAS* 99: 9721-9726.

Tyler RE, Eming SG, Imperiale MJ. 2007. Formation of a multiple protein complex on the adenovirus packaging sequence by the IVa2 protein. *J Virol* 81: 3447:3454

Ugai H, Watanabe S, Suzuki E, Tsutsui-Nakata H, Yokojama KK, Murata T. 2002. Stability of a recombinant adenoviral vector: Optimization of conditions for storage, transport and delivery. *Jpn J Cancer Res* 93: 598-603.

Vallekamp G. 2001. Empty capsids in column-purified recombinant adenovirus preparations. *Hum. Gene Ther* 12: 1923-1936.

Vellinga J, Van der Heijdt S, Hoeben RC. 2005. The adenovirus capsid: major progress in minor proteins. *J Gen ViroL* 86: 1581-1588.

Vellinga J, Van der Wollenberg DJM, Van der Heijdt S, Rabelink MJNE, Hoeben RC. 2005. The coiled-coil domain of the adenovirus type 5 protein IX is dispensable for capsid incorporation and thermostability. *J ViroL* 79: 3206-3210.

Wade MA, Tucker HN. 1998. Antioxidant characteristics of L-histidine. *J Nut Biochem* 9: 308-315.

Waddington Sn, McVey JH, Bhella D, Parker AL, Barker K, Atoda H, Pink R, Buckley SMK, Greig JA, Demby L, Custers J, Morita T. 2008. Adenovirus serotype 5 *hexon* mediates liver gene transfer. *Cell* 132: 397-409.

Wallis C, Melnick JL. 1962. Cationic stabilization- a new property of enteroviruses. *Virology* 16: 504-506.

Wang W. 1999. Instability stabilization and formulation protein pharmaceuticals. *Int J Pharm* 185: 129-188.

Wang W. 2000. Lyophilization and development of solid protein pharmaceutical. *Int J Pharm* 203: 1-60.

Waye MMY, Sing CW. 2010. Anti-viral drugs for human adenoviruses. *Pharmaceuticals* 3: 3343-3354.

Webster A, Kemp G. 1993. The article adenovirus protease is the intact L3 23K protein. *J Gen Virol* 74: 1415-1420.

Webster A, Hay RT, Kempts G. 1993a. The adenovirus protease is activated by a virus-coded disulphide-linked peptide. *Cell* 72: 97-104.

Webster A, Leith IR, Nicholson J, Hounsell J, Hay RT. 1997. Role if predeterminal protein processing in adenovirus replication. *J Virol* 71: 6381-6389.

Webster S. 2013. Redizting lay-term Storage stability of therapeutic proteins. *Pharm Technol* 37(11): 1-5.

Wickham TJ, Mathias P, Cheresch DA, Nemerow GR. 1993. Integrins alpha V beta 3 and alpha V beta 5 promote adenovirus internalization but not virus attachment. *Cell* 73: 309-319.

Wickham TJ, Filardo EJ. 1994. Integrin alpha V beta 5 selectively promotes adenovirus mediated cell membrane permeabilization. *J Cell Biol.* 127(1): 257-264.

Wiethoff CM, Wodrich H, Gerace L, Nemerow GR. 2000. Adenovirus protein VI mediates membrane disruption following capsid disassembly. *J Virol* 79: 1992:2000.

Wodrich H, Guan T, Cingolani G, Von Seggern D, Nemerow G, Gerace L. 2003. Switch from capsid protein import to adenovirus assembly by cleavage of nuclear transport signals. *EMBO J* 22: 6245-6255.

Wu Z, Zhang S. 2004. Formulations of adenovirus for gene therapy. US Patent 6,689,600 B1.

Yamamoto T. 1967. The effect of ion concentration and pH on the thermal stability of a canine adenovirus. *Can J Microbiol* 13: 1139-1149.

Yu L, Milton N, Grateau EG, Mishra DS, Vansickle RE. 1999. Existence of a mannitol hydrate during freeze-drying and practical implications. *J Pharm Sci* 88: 196-198.

Zhai S, Hansen RK, Taylor R, Skepper JN, Sanches R, Slater NKH. 2004. Effect of freezing rates and excipients on the infectivity of a live viral vaccine during lyophilization. *Biotechnol Prog* 20(4): 1113-1120.

Zhang W, Arcos R. 2005. Interaction of the adenovirus major core protein precursor, p VII, with the viral DNA packaging machinery. *Virology* 334: 194-202.

Zhang Y, Kong W. 2008. Immunogenicity of lyophilized recombinant adenovirus-based vaccine expressing HIV-1 gagpol in mice. *Life Sci J* 6(1): 13-17.

Zubieta C, Schoehn G, Chroboczek J, Cusack S. 2005. The structure of the human adenovirus 2 penton. *Mol Cell* 17: 121-135.

7. ANNEXES

Annex 1- Criteris d'acceptació per la determinació de la concentració de partícules d'Ad5 (pv/mL) i resultats de la validació.

Validació de la determinació de la concentració de partícules infectives (UI/mL)			
Paràmetres		Criteri d'acceptació	Resultats
Exactitud		Els valors recuperats han d'estar entre el 80 - 120%	85 - 92%
Linealitat		$r^2 \geq 0.9$	0.99
Precisió	Instrumental	$CV \leq 10\%$	$CV = 4\%$
	Repetibilitat	$CV \leq 15\%$	$CV = 4\%$
	Intermitja	$CV \leq 20\%$	$CV = 11\%$

Annex 2- Exemple de plantilla utilitzada per als càlculs de concentració de partícules víriques infeccioses (UI/mL).

Experimento	Lineality 1	Sample	C1									
Analista	Lluna López											
fecha	01.03.2016	Tehorical value of tested sample	5,00E+08									

Dilution	2,00E+05	4,00E+05	8,00E+05	1,60E+06	3,20E+06	6,40E+06	1,28E+07	2,56E+07	5,12E+07	1,02E+08	2,05E+08	4,10E+08
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			-	-	18							
B			62	29	16							
C			65	27	17							
D			63	32	15							
E			60	33	19							
F			62	30	14							
RC	50	47	51	46	48	48	47	51	46	49	52	48
Blank	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0

All values	Dilution	2,00E+05	4,00E+05	8,00E+05	1,60E+06	3,20E+06	6,40E+06	1,28E+07	2,56E+07	5,12E+07	1,02E+08	2,05E+08	4,10E+08
	Mean	ND	ND	62	30	17	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	SD	ND	ND	2	2	2	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	RSD	ND	ND	3%	8%	11%	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

Blank	mean	0,1	Conform
-------	------	-----	---------

RC	mean	48,6	TU/mL	3,60E+10	Mean	3,60E+10	QC recovery	97%	Conform
----	------	------	-------	----------	------	----------	-------------	-----	---------

Dilution	2,00E+05	4,00E+05	8,00E+05	1,60E+06	3,20E+06	6,40E+06	1,28E+07	2,56E+07	5,12E+07	1,02E+08	2,05E+08	4,10E+08
Depured values			-	-	18							
			62	29	16							
			65	27	17							
			63	32	15							
			60	33	19							
			62	30	14							

TU/mL	mean	4,99E+08	4,83E+08	5,12E+08
	CV	3%	8%	10%

min	4,83E+08
max	5,12E+08
mean	4,98E+08
(max-min)*100/mean	6%

min	4,83E+08
max	5,12E+08
mean	4,98E+08
(max-min)*100/mean	6%

min	4,99E+08
max	4,83E+08
mean	5,12E+08


min	4,83E+08
max	5,12E+08
mean	4,98E+08
(max-min)*100/mean	6%

Sample	C1
Mean	4,98E+08
SD	1,44E+07
n	3
Recovery	100%
RSD	3%
Conform	

Annex 3 – Criteris d'acceptació en la determinació de la concentració de partícules víriques infeccioses (UI/mL) i resultats de la validació.

Validació de la determinació de la concentració de partícules víriques (pv/mL)			
Paràmetres	Criteri d'acceptació	Resultats	
Especificitat	Concentració a blanc = 0 UI/mL	Conforme	
Exactitud	Recuperat 75 - 125%	83 - 117%	
Linealitat	$r^2 \geq 0.9$	$r^2 = 0.99$	
Precisió	Instrumental	$CV \leq 15\%$	CV = 8%
	Repetibilitat	$CV \leq 20\%$	CV = 10%
	Intermitja	$CV \leq 25\%$	CV = 20%

Annex 4 – Recepta del cicle de liofilització de la formulació candidata amb un assecat secundari a 30°C.



Recipe report

Batch: 1703031300_ADELVAC_V_C5_SS30 Start: 03/03/2017 13:00:41 End: 06/03/2017 14:12:09
 User ID: User: User:

Recipe name: ADELVAC_V_C5_SS30°C User Id: User:

Step	Step type	Fluid temperature (°C)	Vacuum (mbar a)	Time HH : MM	Temperature margins	LyoMetrics	LyoDriver
1	FREEZING	-55.0		0.01	OFF		
2	FREEZING	-55.0		6.00	OFF		
3	CHAMBER VACUUM		0.060				
4	PRIMARY DRYING	-40.0	0.060	0.01	OFF	OFF	OFF
5	PRIMARY DRYING	-40.0	0.060	50.00	OFF	OFF	OFF
6	SECONDARY DRYING	30.0	0.000	10.00	OFF	OFF	
7	SECONDARY DRYING	30.0	0.000	4.00	OFF	OFF	
8	END OF CYCLE						

Report date: 09/03/2017 Report hour: 12:08:14 Page 1 of 2

Annex 5 – Freqüència d'anàlisi en l'estudi d'estabilitat a llarg termini.

Condicció d'emmagatzematge	Temps (mesos)							
	0	1	3	6	9	12	18	24
25°C	C	D	D	D	-	-	-	-
5°C		-	D	D	D	D	D	C
-20°C		-	D	C	D	C	D	C

on C= els assajos de títol funcional i humitat residual es realitzen per triplicat, D= els assajos de títol funcional i humitat residual es realitzen per duplicat.

Annex 6 – Exemple de taula d'estabilitat d'un estudi a llarg termini.

Study code								
Drug product:			API Manufacturer:			CONDITIONS:		
Product code:	Batch:		Theoretical batch size:					
Primary packaging			RJ API batch:			Manufacturing date:		Starting time:
Parameters	Specifications	INITIAL	3M	6M	9M	12M	18M	24M
		Date	Date	Date	Date	Date	Date	Date
Visual appearance	White lyophilized form							
Reconstitution time	Report the value							
pH	Report the value							
Residual moisture	Report the value							
Adenovirus particle concentration	Report the value							
Adenovirus infectious titer	Report the value							
Aggregation by DLS	Report the value							

Annex 7 – Criteris d'acceptació en la determinació de la humitat residual i resultats de la validació

Validació de la determinació d'aigua mitjançant un mètode coulomètric de Karl Fischer			
Paràmetres		Criteris d'acceptació	Resultats
Precisió	Nivell inferior (0.4 mg H ₂ O)	CV ≤ 25 %	CV = 0.3%
	Nivell mig (1.3 mg H ₂ O)	CV ≤ 25 %	CV = 3.4%
	Nivell superior (2.5 mg H ₂ O)	CV ≤ 15 %	CV = 0.6%
Exactitud	- 0.4 mg H₂O	Recuperat 90-110%	101.9 - 102.7%
	- 1.0 mg H₂O	Recuperat 97.5-102.5%	98.2 - 101.1%
	- 2.5 mg H₂O	Recuperat 97.5-102.5%	100.1 - 100.4%