



(12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ

(11)



1-0028678

(51)⁷ A61K 9/00; A61K 47/02; A61K 47/10; (13) B
A61K 47/12; C12N 15/86; A61K 47/26;
A61K 47/40; A61K 9/08; A61K 35/76;
A61K 47/18

(21) 1-2016-01311

(22) 16/09/2014

(86) PCT/EP2014/069654 16/09/2014

(87) WO/2015/040002 26/03/2015

(30) 13185200.6 19/09/2013 EP

(45) 25/06/2021 399

(43) 25/07/2016 340A

(73) Janssen Vaccines & Prevention B.V. (NL)

Archimedesweg 4, NL-2333 CN Leiden, The Netherlands

(72) ADRIAANSEN, Janik (NL).

(74) Công ty Cổ phần Sở hữu công nghiệp INVESTIP (INVESTIP)

(54) CHẾ PHẨM CHỨA ADENOVIRUT VÀ PHƯƠNG PHÁP BẢO QUẢN
ADENOVIRUT

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa adenovirut, cụ thể là dược phẩm dạng lỏng chứa adenovirut. Sáng chế còn đề cập đến phương pháp bảo quản adenovirut bao gồm việc bảo chế chế phẩm này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến chế phẩm adenovirut và các sản phẩm được liên quan để sử dụng trong ví dụ liệu pháp gen và/hoặc các ứng dụng vaccin. Cụ thể, các chế phẩm adenovirut lỏng được bộc lộ ở đây, mà cải thiện tính ổn định của adenovirut bằng cách bảo toàn số lượng, hiệu lực (khả năng gây nhiễm) và chất lượng của adenovirut chứa trong đó khi bảo quản ở nhiệt độ khoảng 2-8°C hoặc cao hơn trong khi còn thích hợp với việc dùng ngoài đường tiêu hóa.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Vật truyền adenovirut được xem là hiệu quả nhất và các phương tiện mang được sử dụng rộng rãi để phân phối gen. Thử thách liên tục trong lĩnh vực liệu pháp gen và nghiên cứu vaccin là cần tạo ra chế phẩm adenovirut lỏng mà có khả năng làm ổn định các virut này trong thời gian dài hơn trong khoảng nhiệt độ bảo quản thực tế đối với các sản phẩm được, như từ khoảng 2°C đến khoảng 8°C.

Hoạt tính sinh học của adenovirut phụ thuộc vào tính nguyên vẹn về cấu trúc không gian của ít nhất trình tự nucleotit lõi bao quanh bởi cấu trúc capsit dạng khối hai mươi mặt bao gồm các protein capsit. Không giống các thuốc vô cơ và hữu cơ truyền thống, có các cấu trúc sinh học phức tạp cao và các chất tạo căng thẳng vật lý hoặc hóa học nhỏ có thể góp phần vào sự thoái biến của hạt adenovirut. Do đó, chế phẩm tốt chứa các dạng điều chế adenovirut là điều quan trọng cốt yếu để bảo đảm thời gian bảo quản hợp lý, nhưng việc làm ổn định các vật truyền này còn đặt ra các thách thức cụ thể. Adenovirut có thể mất hiệu lực do sự mất ổn định vật lý, bao gồm sự làm biến tính, sự kết cụm (cả tạo cụm tan và không tan), kết tủa và hút bám, cũng như sự mất ổn định hóa học, bao gồm thủy phân, khử amit hóa, và oxy hóa. Bất kỳ trong số các đường thoái hóa này có thể dẫn đến giảm hoạt tính sinh học, nhưng cũng có khả năng dẫn đến việc tạo ra các sản phẩm phụ hoặc dẫn xuất có độc tính tăng, và/hoặc thay đổi tính sinh miễn dịch.

Do đó có nhu cầu về phương thức biến đổi để tìm ra chế phẩm mạnh đối với adenovirut bảo đảm tính ổn định trong khoảng điều kiện rộng. Loại chất đệm, pH và tá

được cụ thể sẽ cần được tối ưu hóa một cách tỉ mỉ để giữ cho adenovirut ổn định về mặt hóa học, vật lý và sinh học. Do tất cả các yếu tố này có thể thay đổi, việc tìm ra điều kiện tối ưu để tạo chế phẩm adenovirut là gánh nặng nhiều với thách thức, và thành phần của chế phẩm tốt là không thể được dự đoán bằng tiên nghiệm.

Các chế phẩm khô lạnh có tồn tại và ổn định. Tuy nhiên chúng có xu hướng tương đối đắt, đòi hỏi thời gian tiêu thụ, xử lý trước khi sử dụng, và ở mức độ nào đó hiệu lực hiệu lực có thể bị mất trong quá trình làm khô lạnh. Các chế phẩm lỏng mà ổn định trong điều kiện đông lạnh (-80°C) có tồn tại, nhưng chúng đòi hỏi việc vận chuyển đặc biệt và các phương tiện bảo quản đắt đỏ, gần như không thể tạo dây chuyền làm lạnh đáng tin cậy, đặc biệt là ở ngoại vi mạng lưới phân phối. Do đó, chế phẩm ưu tiên đối với adenovirut là chế phẩm lỏng mà mang lại tính ổn định adenovirut ở khoảng nhiệt độ giữa $2-8^{\circ}\text{C}$ hoặc cao hơn. Chế phẩm như vậy có thể được bảo quản trong tủ lạnh bình thường và có thể được sử dụng nhanh chóng và dễ dàng.

Các chế phẩm lỏng đối với adenovirut đã được mô tả trước đây, chẳng hạn trong Evans et al. 2004. Các chế phẩm tốt nhất được lấy ví dụ trong ứng dụng này là chế phẩm đệm Tris có pH nằm trong khoảng giữa 7,5 và 8,5. Các tác giả sáng chế đã phát hiện ở đây rằng các chế phẩm này là gần tối ưu đối với adenovirut. Chế phẩm adenovirut cũng được mô tả trong WO 00/29024, mà chủ yếu đề cập đến các kỹ thuật làm khô lạnh. Chế phẩm chứa adenovirut khác chứa polyol được đề cập trong WO 00/29024 US2005085427 đề cập đến các thành phần SYN3, mà chứa vectơ adenovirut cho interferon anpha 2b. Roberts-K-Evans. Journal of Pharmaceutical Sciences, Hiệp hội dược sĩ Hoa Kỳ. 93, 10. 01.10.2004. 2458-2475 (XP007914498) xử lý với độ ổn định adenovirut được cải thiện. CN1852918 đề cập đến các chế phẩm được làm khô lạnh bao gồm chất tăng cường sự phân phối SYN3 và adenovirut tái tổ hợp mã hóa gen interferon (ví dụ hydroxypropyl betaxyclodextrin hoặc các chất tầy).

Do đó, có nhu cầu trong lĩnh vực này để tìm ra các chế phẩm mà cải thiện tính ổn định của adenovirut bằng cách bảo toàn số lượng và hiệu lực của adenovirut chứa trong đó trong quá trình bảo quản trong khoảng thời gian kéo dài. Tính ổn định của adenovirut cũng nên được giữ trong trường hợp áp lực khuấy trộn trong quá trình vận

chuyển hoặc lực trượt phá trong quá trình sản xuất hoặc sử dụng lâm sàng, và trong điều kiện phổ khí hậu rộng, cụ thể là ở nhiệt độ tăng cao hoặc sau các chu kỳ đông lạnh/rã đông lặp lại. Hơn thế nữa, chế phẩm này nên thích hợp cho các đường dùng dự tính, nên được chống chịu tốt và tốt hơn là nên có thành phần với càng ít thành phần càng tốt. Mục đích của sáng chế là đề xuất chế phẩm adenovirut như vậy.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Các tác giả sáng chế đã tìm ra và mô tả ở đây, chế phẩm adenovirut mà cải thiện tính ổn định của adenovirut bằng cách bảo toàn số lượng và hiệu lực (khả năng gây nhiễm) và chất lượng của adenovirut so với các chế phẩm được bộc lộ trước đây. Đáng chú ý, tổ hợp của đệm xitrat có pH nằm trong khoảng giữa 5,5 và 6,5 cùng với hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HBCD) tạo ra chế phẩm nổi bật theo sáng chế cho việc bảo toàn số lượng, hiệu lực (khả năng gây nhiễm) và chất lượng của adenovirut, kèm theo việc cải thiện tính ổn định tổng thể của adenovirut so với các chế phẩm khác được biết trong lĩnh vực này.

Đối với tất cả các tá dược được sử dụng để tạo ra chế phẩm, một số trong các thành phần này có mặt trong chế phẩm theo sáng chế được đề cập một cách riêng biệt trong lĩnh vực này. Tuy nhiên, tổ hợp rất đặc hiệu của một số thành phần sẽ mang lại cho chế phẩm này đặc tính nổi bật và khả năng làm ổn định của nó. Chế phẩm chính xác theo sáng chế không được bộc lộ trong tình trạng kỹ thuật đã biết. Ngoài ra, không thể đoán trước, dựa trên kỹ thuật đã biết thuộc lĩnh vực vốn không thể dự đoán trước này, rằng chế phẩm này sẽ tạo ra tính ổn định cải thiện như vậy đối với adenovirut.

Do đó, sáng chế đề cập đến chế phẩm adenovirut ổn định và các sản phẩm được liên quan mà có thể, ví dụ, được sử dụng trong liệu pháp gen và/hoặc các ứng dụng vacxin.

Các chế phẩm theo sáng chế chứa dung dịch đệm xitrat ở pH nằm trong khoảng giữa 5,5 và 6,5, và còn chứa hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HBCD). Các chế phẩm này còn chứa thêm muối và chất tẩy không ion. Tùy ý, các chế phẩm theo sáng chế còn bao gồm rượu có 2 hoặc 4 nguyên tử cacbon. Các chế phẩm adenovirut theo sáng chế có thể chịu bảo quản trong thời gian dài ở 2°C đến 8°C hoặc $\leq -65^{\circ}\text{C}$, trong thời gian hơn 6 tháng, 1 năm, 1,5 năm, 2 năm, hoặc hơn.

Các chế phẩm adenovirut theo sáng chế chứa a) adenovirut tái tổ hợp trong b) dung dịch đệm xitrat, mà còn chứa c) hydroxypropyl-beta-xyclodextrin (HBCD); d) muối; và e) chất tẩy không ion, trong đó chế phẩm đã nêu có độ pH nằm trong phạm vi từ 5,5 đến 6,5. Để bảo toàn tính ổn định của adenovirut điều cần thiết là pH của chế phẩm này nằm trong khoảng giữa 5,5 và 6,5.

Tốt hơn là chế phẩm theo sáng chế chứa adenovirus ở độ chuẩn nằm trong khoảng giữa 1×10^7 vp/mL và 1×10^{13} vp/mL.

Theo phương án ưu tiên theo sáng chế nồng độ xitrat trong chế phẩm nằm trong khoảng giữa khoảng 5 mM và 30 mM.

Hydroxypropyl-beta-xyclodextrin (HBCD) là chất bảo vệ đông lạnh ưu tiên. HBCD tốt hơn là có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 1% (khối lượng/khối lượng) và 10% (khối lượng/khối lượng).

Natri clorua (NaCl) là muối được ưu tiên, mà tốt hơn là có mặt ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 20 mM và 200 mM.

Polysorbat-80 là chất tẩy không ion được ưu tiên mà tốt hơn là có nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,005% (khối lượng/khối lượng) và 0,5% (khối lượng/khối lượng).

Theo phương án ưu tiên hơn theo sáng chế chế phẩm có độ pH nằm trong khoảng giữa 5,7 và 6,3, và chứa xitrat ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 5 và 30 mM; HBCD ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 1% (khối lượng/khối lượng) và 10% (khối lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 20 mM và 200 mM; Polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,01% (khối lượng/khối lượng) và 0,05% (khối lượng/khối lượng).

Theo một phương án ưu tiên khác theo sáng chế chế phẩm có độ pH nằm trong khoảng giữa 5,8 và 6,2, và chứa xitrat ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 15 và 25 mM; HBCD ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 3% (khối lượng/khối lượng) và 8% (khối lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 50 mM và 100 mM; Polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,01% (khối lượng/khối lượng) và 0,03% (khối lượng/khối lượng).

Theo phương án còn ưu tiên hơn nữa chế phẩm theo sáng chế có độ pH khoảng 6 và chứa xitrat ở nồng độ khoảng 20 mM; HBCD ở nồng độ khoảng 5% (khối

lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ khoảng 75 mM; Polysorbat-80 ở nồng độ khoảng 0,02% (khối lượng/khối lượng).

Đã chứng minh ở đây rằng việc bổ sung rượu có 2 hoặc 4 nguyên tử cacbon, cụ thể là etanol, vào chế phẩm theo sáng chế, bảo vệ một cách mạch mẽ ngoài mong đợi adenovirut khỏi tổn hại do đông lạnh/rã đông và sau đó hoạt động như chất bảo vệ đông lạnh.

Do đó theo phương án ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế còn chứa rượu 2 hoặc 4 nguyên tử cacbon. Theo phương án còn ưu tiên hơn nữa chế phẩm theo sáng chế chứa etanol. Nồng độ etanol tốt hơn nằm trong khoảng giữa 0,1% (khối lượng/khối lượng) đến 1% (khối lượng/khối lượng).

Theo phương án ưu tiên theo sáng chế chế phẩm có độ pH nằm trong khoảng giữa 5,7 và 6,3, và chứa xitrat ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 5 và 30 mM; HBCD ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 1% (khối lượng/khối lượng) và 10% (khối lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 20 mM và 200 mM; Polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,01% (khối lượng/khối lượng) và 0,05% (khối lượng/khối lượng); và etanol ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,2% (khối lượng/khối lượng) và 0,6% (khối lượng/khối lượng).

Theo một phương án ưu tiên khác theo sáng chế chế phẩm có độ pH nằm trong khoảng giữa 5,8 và 6,2, và chứa xitrat ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 15 và 25 mM; HBCD ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 3% (khối lượng/khối lượng) và 8% (khối lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 50 mM và 100 mM; Polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,01% (khối lượng/khối lượng) và 0,03% (khối lượng/khối lượng); và etanol ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,2% (khối lượng/khối lượng) và 0,6% (khối lượng/khối lượng).

Theo phương án còn ưu tiên hơn nữa chế phẩm theo sáng chế có độ pH khoảng 6 và chứa xitrat ở nồng độ khoảng 20 mM; HBCD ở nồng độ khoảng 5% (khối lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ khoảng 75 mM, Polysorbat-80 ở nồng độ khoảng 0,02% (khối lượng/khối lượng) và etanol ở nồng độ khoảng 0,4% (khối lượng/khối lượng).

Theo một phương án ưu tiên khác chế phẩm theo sáng chế có độ pH khoảng 6 và chứa xitrat ở nồng độ khoảng 20 mM; HBCD ở nồng độ khoảng 5% (khối lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ khoảng 80 mM, Polysorbat-80 ở nồng độ khoảng 0,025% (khối lượng/khối lượng) và etanol ở nồng độ khoảng 0,4% (khối lượng/khối lượng).

Theo phương án còn ưu tiên hơn nữa chế phẩm theo sáng chế có pH khoảng 6 và chứa xitrat ở nồng độ khoảng 20 mM; HBCD ở nồng độ khoảng 5% (khối lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ khoảng 80 mM, Polysorbat-80 ở nồng độ khoảng 0,025% (khối lượng/khối lượng) và etanol ở nồng độ khoảng 0,4% (khối lượng/khối lượng).

Theo một phương án ưu tiên khác theo sáng chế các chế phẩm là các chế phẩm lỏng (đông lạnh). Theo một phương án khác nữa, các chế phẩm theo sáng chế thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa.

Theo một phương án, các chế phẩm theo sáng chế được chứa trong lọ. Theo một phương án khác, các chế phẩm được chứa trong túi hoặc chai. Theo một phương án khác nữa các chế phẩm được chứa trong xylanh hoặc vỏ.

Sáng chế còn đề cập đến Phương pháp bảo quản adenovirut mà bao gồm việc bào chế chế phẩm theo sáng chế.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến Phương pháp bảo quản adenovirut mà bao gồm việc bào chế chế phẩm như được mô tả ở đây và bảo quản chế phẩm này ở nhiệt độ nằm trong khoảng giữa 2°C và 8°C.

Tính ổn định trong thời gian dài tăng trong khoảng nhiệt độ rộng dẫn đến kéo dài thời gian bảo quản chế phẩm virus được bộc lộ ở đây, cho phép việc bảo quản và sử dụng cho vật chủ cuối cùng các chế phẩm này trong thời gian tốt nhất là khoảng 1-2 năm, hoặc hơn với sự giảm chấp nhận được về hiệu lực virus (tức là không nhiều hơn 0,31 lôga mỗi hai năm ở 2-8°C). Ngoài ra, các chế phẩm theo sáng chế thể hiện tính ổn định trong quá trình tiếp xúc với nhiệt độ tăng cao, chu kỳ đông lạnh/rã đông kéo dài và khuấy trộn.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Hình 1. Là biểu đồ thể hiện sự mất hiệu lực (ở đơn vị lôga IU/mL) (Δ) của Ad26 trong thời gian nhiệt độ tăng lên ở 25°C ở chế phẩm B (c) và chế phẩm đối chứng (hình tròn đặc). Δ hiệu lực trung bình ($n=4$) được thể hiện, phản ánh hiệu lực mẫu chịu căng thẳng-hiệu lực mẫu đối chứng. Hiệu lực được đo bằng QPA.

Hình 2. Là biểu đồ thể hiện sự mất hiệu lực (ở đơn vị lôga IU/mL) (Δ) của Ad35 trong quá trình nhiệt độ tăng ở 25°C ở chế phẩm B (hình thoi rỗng) và chế phẩm đối chứng (hình tròn đặc). Δ hiệu lực trung bình ($n=4$) được thể hiện, phản ánh hiệu lực mẫu chịu căng thẳng-hiệu lực mẫu đối chứng. Hiệu lực được đo bằng QPA.

Hình 3. Là biểu đồ thể hiện nhiệt nóng chảy của Ad26 ở chế phẩm B và chế phẩm đối chứng. Phân tích TMA (Thử nghiệm nóng chảy do nhiệt) ($n=3$) đối với Ad26 được thực hiện trên các mẫu $t=0$.

Hình 4. Là biểu đồ thể hiện nhiệt nóng chảy của Ad35 ở chế phẩm B và chế phẩm đối chứng. Phân tích TMA (Thử nghiệm nóng chảy do nhiệt) ($n=3$) đối với Ad35 được thực hiện trên các mẫu $t=0$.

Hình 5. Là biểu đồ thể hiện các giá trị delta Ct (ΔCt) của Ad26 ở chế phẩm B có và không có NaCl, EDTA, etanol và tổ hợp của chúng sau 69 ngày ở 25°C. Các giá trị ΔCt này tương quan trực tiếp với sự mất hiệu lực, trong đó con số cao hơn nghĩa là mất hiệu lực nhiều hơn.

Hình 6. Là biểu đồ thể hiện các giá trị delta Ct (ΔCt) của Ad26 ở chế phẩm B có và không có NaCl, EDTA, etanol và tổ hợp của chúng sau 16 ngày ở 35°C. Các giá trị ΔCt này tương quan trực tiếp với sự mất hiệu lực, trong đó con số cao hơn nghĩa là mất hiệu lực nhiều hơn.

Hình 7. Là biểu đồ thể hiện các giá trị delta Ct (ΔCt) của Ad26 ở chế phẩm B có và không có NaCl, EDTA, etanol và tổ hợp của chúng sau 30 chu kỳ đông lạnh/rã đông tiếp theo là 1 ngày khuấy trộn. Các giá trị ΔCt này tương quan trực tiếp với sự mất hiệu lực, trong đó con số cao hơn nghĩa là mất hiệu lực nhiều hơn.

Hình 8. Là biểu đồ thể hiện phép đo độ đục được đo ở độ hấp thụ ở 350 nm của Ad26 ở chế phẩm B có và không có NaCl, EDTA, etanol và tổ hợp của chúng có $t=0$ (hình tròn đặc), 25°C trong 69 ngày (hình thoi rỗng), 35°C trong 16 ngày (hình tam giác đặc) và 30 chu kỳ đông lạnh/rã đông tiếp theo là khuấy trộn (hình chữ nhật rỗng).

Hình 9. Là biểu đồ thể hiện huỳnh quang nội tại of Ad26 ở chế phẩm B có và không có NaCl, EDTA, etanol và tổ hợp của chúng ở $t=0$ (hình tròn đặc), 25°C trong 69 ngày (hình thoi rỗng), 35°C trong 16 ngày (hình tam giác đặc) và 30 chu kỳ đông lạnh/rã đông tiếp theo là khuấy trộn (hình chữ nhật rỗng).

Hình 10. Là biểu đồ thể hiện nhiệt nóng chảy của Ad26 ở chế phẩm F và chế phẩm đối chứng. Phân tích TMA ($n=3$) đối với Ad26 được thực hiện trên các mẫu $t=0$.

Hình 11. Là sơ đồ cặp của xác suất thành công đối với hiệu lực CQA (Δ Giới hạn hiệu lực $\geq -0,30$ lôga IU/mL) với điều kiện căng thẳng Đông lạnh/rã đông (FT) + khuấy trộn (AG) + bảo quản ở 35°C. Thang tỉ lệ đối với xác suất thành công là từ 0,4 (xám sáng) đến 1 (đen). Toàn bộ vùng thử nghiệm được khảo sát. Trong các hình vuông màu trắng là không gian thiết kế được đề xuất dựa trên sơ đồ này.

Mô tả chi tiết sáng chế

Như đã đề cập ở trên, có nhu cầu trong lĩnh vực này về việc tìm kiếm các chế phẩm mà cải thiện tính ổn định của adenovirus bằng cách bảo toàn số lượng và hiệu lực của adenovirus chứa trong đó trong khi bảo quản trong khoảng thời gian kéo dài.

Một vài tài liệu tham khảo bộc lộ việc sử dụng các thành phần cụ thể đối với chế phẩm adenovirus. Altaras et al. bộc lộ xitrat là một phần của danh mục lớn về chất ức chế sự oxy hóa gốc tự do có thể có. Danh mục này còn bao gồm tổ hợp của EDTA và etanol (EDTA/etanol), mà được xác định là chất ức chế khác nữa đối với sự oxy hóa gốc tự do. Chế phẩm theo sáng chế sử dụng xitrat làm đệm và không phải làm chất chống oxy hóa.

Renteria và cộng sự nhận biết hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HBCD) dưới dạng một trong các chất phụ gia được sử dụng để đẩy mạnh tính ổn định của các protein nhất định và để tránh sự kết cụm trong quá trình dùng qua mũi. Renteria và cộng sự bộc lộ việc sử dụng hydroxypropyl-beta-cyclodextrin trong trường hợp chế phẩm thích hợp để sử dụng qua mũi tăng cường khả năng hấp thụ qua niêm mạc. Tất cả các protein là rất khác nhau so với các virus sống như adenovirus, về mặt cấu trúc, tích điện và kích thước. Do đó, cơ chế làm ổn định đối với adenovirus là hoàn toàn khác và không thể dự đoán được dựa trên cơ chế làm ổn định đối với các protein.

Công bố sáng chế quốc tế WO029024 bộc lộ hydroxypropyl-beta-xyclodextrin dưới dạng một phần của danh mục lớn về các chất bảo vệ khô lạnh có thể có được sử dụng để bảo chế chế phẩm được làm khô lạnh. Công bố sáng chế quốc tế WO029024 đề cập đến chế phẩm được làm khô lạnh đối nghịch với chế phẩm lỏng như được bộc lộ theo sáng chế. Lợi thế của chế phẩm lỏng đó là nó ít đắt đỏ hơn, và việc xử lý trước khi dùng cần ít thời gian hơn và ít dễ bị lỗi hoàn nguyên hoặc dùng liều lâm sàng. Hơn thế nữa, việc nâng quy mô đối với quy trình làm khô lạnh có thể là nỗ lực bết tắc.

Các tác giả sáng chế đã phát hiện và mô tả ở đây, chế phẩm adenovirut mà cải thiện tính ổn định adenovirut bằng cách bảo toàn số lượng và hiệu lực (khả năng gây nhiễm) và chất lượng của adenovirut so với các chế phẩm được bộc lộ trước đây.

Các chế phẩm theo sáng chế chứa ít nhất một adenovirut tái tổ hợp. Việc tạo ra các vật truyền adenovirut được hiểu rõ trong lĩnh vực này và bao gồm việc sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử chuẩn, như các kỹ thuật được bộc lộ trong, ví dụ, Sambrook và cộng sự, *Molecular Cloning, Laboratory Manual*, phiên bản thứ hai, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989), Watson và cộng sự, *Recombinant DNA*, 2d ed., Scientific American Books (1992), và Ausubel và cộng sự, *Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley Interscience Publishers, NY (1995), và các tài liệu khác được đề cập ở đây. Vấn đề là, vật truyền adenovirut có thể thiếu ít nhất một gen chức năng thiết yếu của vùng E1, ví dụ, vùng E1a và/hoặc vùng E1b, của bộ gen adenovirut mà cần thiết để sao chép virut. Như đã biết bởi người có hiểu biết trung bình đối với việc sản xuất adenovirut, trong trường hợp các đoạn khuyết của các vùng thiết yếu từ bộ gen adenovirut, các chức năng được mã hóa bởi các vùng này phải được cung cấp ở các tế bào trans, tốt hơn là bởi tế bào sản xuất, chẳng hạn được tích hợp trong bộ gen, hoặc dưới dạng được gọi là adenovirut trợ giúp hoặc plasmit trợ giúp, khi sản xuất adenovirut tái tổ hợp.

Việc nhân giống adenovirut tái tổ hợp đã được mô tả chi tiết trong: Patent Mỹ 6,492,169 hoặc trong WO 03/104467, Patent Mỹ số 5,559,099, 5,837,511, 5,846,782, 5,851,806, 5,994,106, 5,994,128, 5,965,541, 5,981,225, 6,040,174, 6,020,191, và 6,113,913, và Thomas Shenk, "Adenoviridae và their Replication", M. S. Horwitz, "Adenovirut", lần lượt ở chương 67 và 68, trong *Virology*, B. N. Fields và cộng sự,

eds., 3d ed., Raven Press, Ltd., New York (1996), mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Vật truyền adenovirut thiếu khả năng sao chép có thể được tạo ra bằng cách sử dụng loài, chủng, typ phụ hoặc hỗn hợp của các loài, chủng hoặc typ phụ bất kỳ của adenovirut hoặc adenovirut thể khảm làm nguồn ADN vật truyền (xem chẳng hạn WO 96/26281, WO 00/03029). Theo các phương án nhất định theo sáng chế, các kiểu huyết thanh của adenovirut ở người bao gồm kiểu huyết thanh bất kỳ trong các kiểu huyết thanh 2, 4, 5, 7, 11, 26, 34, 35, 36, 48, 49 hoặc 50 hoặc các kiểu huyết thanh adenovirut lai hoặc đột biến bất kỳ. Theo phương án ưu tiên theo sáng chế adenovirut tái tổ hợp là từ kiểu huyết thanh adenovirut của người 5, 26 hoặc 35.

Theo các phương án khác, adenovirut theo sáng chế là adenovirut của khỉ, tốt hơn là adenovirut của tinh tinh hoặc gôrila. Các adenovirut này thường có tỉ lệ phơi nhiễm thấp và/hoặc độ chuẩn kháng thể trung hòa có sẵn thấp trong quần thể người.

Theo các phương án khác, adenovirut theo sáng chế còn chứa axit nucleic khác loài. Axit nucleic khác loài thích hợp được biết rõ bởi người có hiểu biết trung bình, và chẳng hạn có thể bao gồm các khung đọc mở của gen chuyển, chẳng hạn khung đọc mở mã hóa các polypeptit mà đáp ứng miễn dịch đối với nó được mong muốn khi vật truyền này được sử dụng cho các mục đích tạo vacxin, ví dụ các gen chuyển thích hợp để tạo ra đáp ứng miễn dịch chống lại bệnh sốt rét (xem ví dụ WO 2004/055187), HIV, bệnh lao (xem ví dụ WO 2006/053871), các virus nhất định, v.v., đều được biết bởi người có hiểu biết trung bình. Trong thực tế, bản chất của gen chuyển không phải là quyết định đối với sáng chế, nó có thể là trình tự axit nucleic khác loài bất kỳ, và do đó không cần nói thêm ở đây.

Thuật ngữ “tính ổn định” như được sử dụng ở đây chỉ tính kháng tương đối đối với sự thoái hóa của các hạt adenovirut trong chế phẩm giữ được hiệu lực của nó trên thang thời gian về lợi ích được mong đợi của nó. Tốt hơn là, hiệu lực thể hiện sự giảm không nhiều hơn 0,31loga mỗi hai năm ở 2-8°C.

Thuật ngữ “hiệu lực” như được sử dụng ở đây chỉ phép đo hoạt tính adenovirut được biểu hiện dưới dạng các đơn vị gây nhiễm đo được trong thử nghiệm hiệu lực dựa trên tế bào, mà được mô tả dưới đây.

Chế phẩm theo sáng chế thể hiện sự giảm về hiệu lực không nhiều hơn 0,41ôga mỗi 60 ngày và sự giảm độ chuẩn không nhiều hơn 0,31ôga mỗi 60 ngày trong nghiên cứu làm tăng tính ổn định được thực hiện bằng cách ủ các chế phẩm ở $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ trong thời gian 1 đến 3 tháng.

Chế phẩm theo sáng chế còn thể hiện sự giảm về hiệu lực không nhiều hơn 0,21ôga mỗi 10 chu kỳ trong nghiên cứu trong đó các lọ nhỏ được đưa vào các chu kỳ đông lạnh/rã đông lặp lại tiếp theo là 24 giờ khuấy trộn ở nhiệt độ trong phòng theo phương nằm ngang ở 200 vòng/phút.

“Tá được được dụng” nghĩa là chất trợ bất kỳ mà được kết hợp với phân tử hoạt tính như virus để điều chế dạng liều được chấp nhận hoặc thuận tiện. “Tá được được dụng” là tá được mà không độc đối với người nhận ở các liều dùng và nồng độ được sử dụng, và thích hợp với các thành phần khác của chế phẩm chứa dạng điều chế virus. Ví dụ về tá được là chất bảo vệ đông lạnh, chất tẩy không ion, đệm, muối, chất ức chế sự oxy hóa gốc tự do.

Thuật ngữ "sản phẩm phụ" bao gồm các sản phẩm không mong muốn, mà làm giảm hoặc hạ thấp tỉ lệ của adenovirus chữa bệnh/phòng bệnh trong chế phẩm cho trước. Các sản phẩm phụ phổ biến bao gồm các dạng kết cụm của adenovirus và các mảnh của adenovirus, thu được từ ví dụ việc làm biến tính protein, khử amit, thủy phân hoặc sự kết hợp của chúng. Điển hình là, các dạng kết cụm là các phức mà có khối lượng phân tử lớn hơn hạt virus phân lập.

Chế phẩm mà cải thiện tính ổn định của adenovirus, còn được gọi là “chế phẩm ổn định” như được sử dụng ở đây là chế phẩm trong đó adenovirus trong đó về cơ bản giữ được sự nguyên vẹn về vật lý và/hoặc hóa học và/hoặc hoạt tính sinh học của nó khi bảo quản. Tính ổn định có thể được đánh giá bằng cách các định các đặc tính khác nhau như số lượng (của adenovirus trong chế phẩm), hiệu lực, và/hoặc các khía cạnh chất lượng khác của adenovirus trong chế phẩm trong một khoảng thời gian và trong các điều kiện bảo quản nhất định. Các đặc tính này của chế phẩm adenovirus có thể được đo ở nhiệt độ tăng (dự đoán trước đối với các nhiệt độ trong thời gian thực) hoặc trong các điều kiện căng thẳng khác, chẳng hạn các chế phẩm có thể được đưa vào ở 25°C hoặc đưa vào các chu kỳ đông lạnh/rã đông và khuấy trộn để nghiên cứu về hiệu

quả của các chế phẩm khác nhau tối đa hóa thời gian bảo quản. Các đặc tính mà xác định tính ổn định này có thể được xác định bằng ít nhất một trong các phương pháp được chọn từ nhóm gồm kiểm tra bằng mắt, phản ứng chuỗi polymeraza định lượng hạt virus (vp-QPCR), Thử nghiệm hiệu lực dựa trên QPCR (QPA), Sắc ký lỏng hiệu năng cao pha ngược (RP-HPLC) và Kết lắng ly tâm chênh lệch (DCS), Thử nghiệm nóng chảy do nhiệt (TMA), Phép đo độ đục, và Huỳnh quang nội tại.

Phản ứng chuỗi polymeraza định lượng hạt virus (vp-QPCR)

vp-QPCR được phát triển để định lượng các hạt adenovirus nhờ sử dụng các mồi mà hướng đích đến vùng 100 bp của gen khởi động CMV của catxet gen chuyển có mặt trong vật truyền adenovirus. Vấn đề là, phương pháp QPCR này dựa trên hoạt tính exonuclease của Taq polymeraza, mà dẫn đến sự thoái hóa của mẫu dò huỳnh quang đặc hiệu ở giữa sản phẩm khuếch đại 100 bp. Mẫu dò này liên kết cộng hóa trị với chất phát sáng và chất dập tắt, và sự thoái hóa của nó giải phóng các chất phát tán ra khỏi chất dập tắt với sự phát huỳnh quang sau đó tỉ lệ với lượng khuôn. Các giá trị định lượng thu được từ các chu kỳ ngưỡng (Ct), chu kỳ mà ở đó sự tăng tín hiệu huỳnh quang vượt quá giá trị ngưỡng. Ngưỡng phát hiện huỳnh quang dựa trên ADN được thiết lập trên nền một chút. Số lượng chu kỳ ở đó huỳnh quang vượt quá ngưỡng được gọi là chu kỳ ngưỡng (Ct) hoặc, theo hướng dẫn của MIQE, chu kỳ định lượng (Cq) (Bustin et al, 2009). Trong pha khuếch đại theo hàm mũ, trình tự ADN đích gấp đôi lên sau mỗi chu kỳ. Ví dụ, mẫu ADN mà Ct của nó đi trước Ct của một mẫu khác 3 chu kỳ chứa khuôn nhiều hơn $2^3 = 8$ lần. Do đó, giá trị Ct cao hơn thể hiện lượng nhỏ hơn của ADN đích và giá trị Ct thấp hơn thể hiện tính khả dụng cao của ADN đích. Phép định lượng tuyệt đối có thể được thực hiện bằng cách so sánh đường cong chuẩn được tạo ra bởi dịch pha loãng theo thứ tự adenovirus gốc mà nồng độ của nó đã được xác định bằng mật độ quang ở 260 nm (OD_{260}). Các giá trị Ct của vật liệu kiểm tra được lập biểu đồ với các giá trị Ct của đường cong chuẩn, mà tạo ra số lượng đúng và chính xác của các hạt vật truyền.

Khi được sử dụng làm chỉ báo sau khi ủ trên các tế bào thành thực E1 (QPA, xem dưới đây), các mẫu thoái hóa hơn sẽ dẫn đến giá trị Ct delta ($t=0$ trừ) cao hơn và các chế phẩm ổn định hơn sẽ dẫn đến các giá trị Ct thấp hơn.

Thử nghiệm hiệu lực dựa trên QPCR (QPA)

Để định lượng hiệu lực adenovirut, QPA kết hợp QPCR với các thử nghiệm khả năng gây nhiễm dựa trên nuôi cấy mô. Thử nghiệm này được dựa trên quan sát thử nghiệm sự xuất hiện của ADN virus tổng hợp mới là rất nhanh sau khi ủ lớp đơn tế bào, và tỉ lệ thuận với nồng độ virus đưa vào trên khoảng rộng bội số gây nhiễm (MOI). Các dịch pha loãng của các mẫu (pha loãng không có điểm cuối) được cho lên các lớp đơn tế bào HEK293 trong đĩa 96 giếng. Sự nhiễm được để diễn ra trong 3 giờ ở 35°C. Các lỗ được hút ra và làm đầy lại bằng môi trường không chứa adenovirut. Các đĩa được ủ thêm 42 giờ trước khi phân giải tế bào bằng dung dịch Triton X-100 và một bước đông lạnh/rã đông để giải phóng ADN adenovirut. QPCR được thực hiện trên các dịch ly giải tế bào pha loãng theo phương pháp được mô tả ở trên. Độ chuẩn khả năng gây nhiễm được tính bằng cách so sánh với đường cong chuẩn được tạo ra bởi các giá trị Ct của mẫu có khả năng gây nhiễm đã biết, mà được xác định bằng sự chuẩn độ điểm cuối. Theo cách khác, hiệu lực delta có thể được thể hiện trực tiếp dưới dạng các giá trị Ct do độ chuẩn khả năng gây nhiễm, hoặc hiệu lực, là tương quan trực tiếp với các giá trị Ct. Đặc biệt là khi so sánh các khác biệt tương đối về hiệu lực giữa các chế phẩm, đây là phương pháp nhanh và đáng tin cậy.

Sắc ký lỏng hiệu năng cao pha ngược (RP-HPLC)

Để xác định một số khía cạnh chất lượng của adenovirut, có thể phân tích đặc tính protein của adenovirut bằng sắc ký lỏng hiệu năng cao pha ngược (RP-HPLC). HPLC tách các thành phần của hỗn hợp bằng cách sử dụng các loại tương tác hóa học khác nhau giữa mẫu, pha động (đệm hoặc dung môi) và pha tĩnh (vật liệu sắc ký lèn chặt trong cột). Bơm áp suất cao làm pha động di chuyển trong cột và bộ dò thể hiện thời gian lưu (t_R ; thời gian giữa bơm mẫu và xuất hiện đỉnh tối đa) của các phân tử bằng cách dò độ hấp thụ UV ở 280 nm. Sự tách của RP-HPLC là dựa trên sự khác biệt về tính không ưa nước. Pha tĩnh không phân cực được làm bằng các mạch alkyl kỵ nước (độ dài mạch: C4, C8 và C18). Pha động phân cực là nước với 0,1% trifloaxetic (TFA). Các hợp chất mà gắn vào các cột này được tách rửa nhờ sử dụng nồng độ tăng lên của axetonitril 0,1% TFA. Nhìn chung, chất phân tích với diện tích bề mặt kỵ nước lớn hơn có thời gian lưu lâu hơn, trong khi đó sự có mặt của các nhóm phân cực làm

giảm thời gian lưu. Mẫu RP-HPLC tiêu biểu của adenovirut gồm có 10 hoặc 14 protein, bao gồm protein lõi (VII), bazơ penton (III) và hexon (II).

Sa lắng ly tâm chênh lệch (DCS)

DCS là phương pháp để đo sự phân bố cỡ hạt (sự kết cụm) bằng cách sa lắng. Trong máy ly tâm dạng đĩa, các hạt lắng xuống theo gradien sucroza (có độ nhớt và tỉ trọng đã biết) dưới lực hút cao theo định luật Stokes. Tốc độ sa lắng tăng theo bình phương đường kính hạt, vì vậy các hạt mà khác nhau về kích cỡ chỉ vài phần trăm lắng xuống theo tốc độ khác nhau đáng kể. Thời gian cần thiết để đạt đến bộ cảm biến được sử dụng để tính cỡ hạt. Khoảng đo của phương pháp này là khoảng 0,02 đến 30 micron.

Thử nghiệm nóng chảy do nhiệt (TMA)

Thử nghiệm nóng chảy do nhiệt (TMA) có thể được sử dụng để xác định nhiệt độ nóng chảy (T_m) của adenovirut trong các dạng bào chế thử nghiệm, đó là nhiệt độ mà vỏ capsit của virut biến tính. Sự phân rã của virut có thể được đo có thể được đo thời gian thực nhờ sử dụng thuốc nhuộm huỳnh quang xen vào giữa dsADN. Thuốc nhuộm huỳnh quang này chỉ tạo ra tín hiệu hình quang khi liên kết với ADN, mà được giải phóng khi hạt virut phân rã. Huỳnh quang theo hàm mũ tăng lên khi vỏ capsit tan chảy có thể được đo nhờ sử dụng máy QPCR thông thường trong quá trình tăng nhiệt độ theo bậc. Các mẫu được pha loãng đến nồng độ giống nhau (khoảng là 4×10^9 đến 1×10^{12} vp/mL) trong các dạng bào chế cụ thể và trộn với thuốc nhuộm SYBRGreen (nồng độ cuối 1X) trong thể tích 50 μ L. Nhiệt độ được tăng lên 0,5°C mỗi 30 giây bắt đầu từ 30°C lên đến 79°C. Từ dữ liệu huỳnh quang thô, các dẫn xuất thứ nhất và thứ hai được tính và nhiệt độ tan chảy được đọc ở hệ số chặn của dẫn xuất thứ hai với trục x. Nhiệt độ nóng chảy cao hơn (T_m) có thể là chỉ báo của dạng bào chế ổn định hơn.

Thử nghiệm độ đục

Phép đo độ đục đo sự giảm cường độ ánh sáng truyền qua do sự tán xạ của các hạt trong mẫu (độ hấp thụ biểu kiến), được dò ở bước sóng ở đó các phân tử trong mẫu không hấp thụ ánh sáng (ví dụ 350 nm đối với các mẫu trong đó các protein là nhóm mang màu chính). Khi các phân tử kết cụm hoặc tạo phức siêu phân tử, sự tán xạ ánh sáng, mà là ngẫu nhiên khi từ các hạt riêng biệt, đã trở nên dính liền, và nhờ đó

cường độ đo được tăng lên. Điều này làm cho phép đo sự tán xạ ánh sáng và độ đục là các kỹ thuật hữu ích để d sự kết cụm và tạo phức hoặc phân rã.

Trong thử nghiệm độ đục, các mẫu được chuyển lên vi đĩa đáy phẳng, truyền tia UV trong ba lần. Đĩa được phủ bằng đồ bịt truyền tia UV. Phổ hấp thụ được ghi bằng máy đọc vi đĩa giữa 230 và 500 nm, và độ hấp thụ ở 975 nm được đo để xác định và có thể là hiệu chỉnh sự chênh lệch của đường truyền quang. Các mẫu đối chứng gồm các chế phẩm mà không có adenovirut cũng được đưa vào thử nghiệm để hiệu chỉnh các thành phần nền tán xạ hoặc hấp thụ nếu cần. Độ hấp thụ biểu kiến ở 350 nm được sử dụng làm số đo định lượng cho độ đục.

Thử nghiệm độ đục là sự chỉ báo tính ổn định đối với các mẫu adenovirut. Sự kết cụm virut dẫn đến sự tăng độ đục và giảm sự phân rã vỏ capsit. Độ chính xác của thử nghiệm là $< 5\%$ (CV%) ở giá trị độ đục > 1 NTU.

Độ đục thu được đối với các mẫu chịu căng thẳng nên luôn được so sánh với các mẫu đối chứng. Do sự tăng hoặc giảm sau khi áp dụng căng thẳng phụ thuộc vào quá trình thoái biến và đặc hiệu đối với mỗi Thành phần được tính (API), nó không thể được dự đoán. Sự thay đổi (cao hơn hoặc thấp hơn) so với các mẫu $t=0$ là chỉ báo về chế phẩm kém ổn định hơn. Các mẫu chịu căng thẳng tương đương với các mẫu $t=0$ được mong đợi là ổn định hơn.

Thử nghiệm huỳnh quang nội tại

Các protein vỏ capsit của adenovirut chứa các axit amin thơm mà phát ra ánh sáng lại sau kích thích, cụ thể là tryptophan và ở mức độ thấp hơn là tyrosin và phenylalanin. Sự phát xạ cực đại và hiệu suất lượng tử của tryptophan phụ thuộc mạnh vào tính phân cực của môi trường của nó. Trong môi trường chứa nước, phân cực (ví dụ bề mặt của protein hình cầu) hiệu suất lượng tử là tương đối thấp, trong khi trong môi trường không phân cực (ví dụ bên trong thể kết cụm) hiệu suất lượng tử tăng. Đặc tính làm làm cho sự phát huỳnh quang tryptophan trở thành công cụ hữu dụng để nghiên cứu sự thay đổi cấu trúc protein, sự kết cụm, và sự tương tác phân tử.

Trong thử nghiệm huỳnh quang nội tại, các mẫu được chuyển trong ba phần lên vi đĩa đáy phẳng, truyền tia UV. Đĩa được phủ bằng đồ bịt truyền tia UV. Sự phát huỳnh quang tryptophan được đo bằng máy đọc vi đĩa nhờ sử dụng bộ lọc kích thích

với bước sóng trung tâm là 280 nm và chiều rộng sóng là 10 nm, và bộ lọc phát xạ với bước sóng trung tâm là 340 nm và chiều rộng sóng là 10 nm. Vòi đáy được sử dụng để hạn chế thấp nhất ảnh hưởng của độ bọt và hình dạng mặt khum chất lỏng.

Cường độ huỳnh quang được biết trong lĩnh vực này là phép đo nhạy đối với tính ổn định adenovirut. Cả sự tăng hoặc giảm đều có thể được quan sát khi có căng thẳng, tùy theo bản chất của các thay đổi xuất hiện ở mẫu. Sự tháo gập protein và phân rã vỏ capsit được mong đợi là dẫn đến sự giảm huỳnh quang nội tại, và sự kết cụm được mong đợi là dẫn đến sự tăng huỳnh quang. Độ chính xác của thử nghiệm là < 5% (CV%) trong khoảng sử dụng.

Huỳnh quang thu được đối với các mẫu chịu căng thẳng luôn cần được so sánh với các mẫu đối chứng. Do sự tăng hoặc giảm sau khi áp dụng căng thẳng phụ thuộc vào quá trình thoái biến và đặc hiệu đối với mỗi Thành phần được tính (API), nó không thể được dự đoán. Sự thay đổi (cao hơn hoặc thấp hơn) so với các mẫu $t=0$ là chỉ báo về chế phẩm kém ổn định hơn. Các mẫu chịu căng thẳng tương đương với các mẫu $t=0$ được mong đợi là ổn định hơn.

Adenovirut "giữ tính ổn định vật lý của nó" trong chế phẩm được, nếu nó, bên cạnh các yếu tố khác, thể hiện sự giảm tối thiểu (tức là $0,3\log/2$ năm) về mặt số lượng và hiệu lực, và không thể hiện cải biến protein quan trọng. Ngoài ra, không có tín hiệu về sự kết cụm, cần quan sát được sự kết lắng, thay đổi màu sắc và/hoặc độ trong khi khảo sát bằng mắt.

"Khoảng" như được sử dụng trong sáng chế nghĩa là $\pm 10\%$, trừ khi có quy định khác.

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm mà ổn định adenovirut và đề cập đến các sản phẩm được liên quan, tốt hơn là để sử dụng trong liệu pháp gen và/hoặc các ứng dụng vacxin. Chế phẩm chứa virut ổn định ưu tiên bộc lộ ở đây là chế phẩm adenovirut lỏng, mà thể hiện tính ổn định tính ổn định adenovirut tăng khi bảo quản trong khoảng $2-8^{\circ}\text{C}$ trong khi còn thích hợp với việc dùng ngoài đường tiêu hóa. Tuy nhiên, các chế phẩm này cũng có thể được bảo quản ở nhiệt độ thấp hơn, ví dụ -20°C hoặc thấp hơn, -40°C hoặc thấp hơn, -65°C hoặc thấp hơn, -80°C hoặc thấp hơn.

Chúng cũng có thể ổn định hơn ở nhiệt độ trên 8°C, ví dụ 25°C hoặc thậm chí cao hơn.

Các chế phẩm này mà có thể làm ổn định adenovirut chứa đệm xitrat, hydroxypropyl-beta-xyclodextrin(HBCD), muối và chất tẩy không ion, cũng như các thành phần bổ sung tùy ý mà tăng cường tính ổn định cho virut được đưa vào. PH của đệm này nằm trong khoảng 5,5 và 6,5.

Các chế phẩm theo sáng chế tạo ra tính ổn định cho adenovirut ở các nồng độ virut khác nhau, đơn trị hoặc đa trị, và có thể được dùng cho các loài sinh vật có xương sống, tốt hơn là động vật có vú và đặc biệt là con người. Các chế phẩm virut ổn định theo sáng chế là các chế phẩm dựa trên adenovirut, mà có thể, chẳng hạn, được sử dụng làm vacxin mà có thể mang lại lợi ích phòng bệnh đối với các cá thể không bị nhiễm trước đó và/hoặc tạo ra hiệu quả chữa bệnh.

Một khía cạnh ưu tiên theo sáng chế là chế phẩm adenovirut tái tổ hợp (tức là, adenovirut chứa toàn bộ hoặc một phần gen chuyển mã được biểu hiện ở vật chủ đích sau khi dùng cho vật chủ, như theo phương pháp dựa trên việc tiêm vacxin gen hoặc liệu pháp gen động vật có vú/người bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình) mà thể hiện các đặc tính về tính ổn định tăng cường được mô tả ở đây với nồng độ virut nằm trong khoảng từ 1×10^7 vp/mL (hạt virut/mL) đến khoảng 1×10^{13} vp/mL. Khoảng ưu tiên hơn là từ khoảng 1×10^9 đến 1×10^{13} vp/mL, với nồng độ virut được đặc biệt ưu tiên nằm trong khoảng từ 1×10^{10} đến 5×10^{12} vp/mL. Các chế phẩm chữa bệnh hoặc phòng bệnh theo các chế phẩm theo sáng chế có thể được dùng cho cá thể với lượng đủ để điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn tương ứng. Lượng có hiệu quả để dùng cho người có thể, tất nhiên, thay đổi theo nhiều yếu tố khác nhau như tình trạng của từng cá thể, cân nặng, giới tính và tuổi. Các yếu tố khác bao gồm chế độ dùng. Theo phương án ưu tiên, các chế phẩm theo sáng chế thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa.

Các chế phẩm theo sáng chế là dung dịch đệm xitrat có pH nằm trong khoảng giữa 5,5 và 6,5, còn bao gồm hydroxypropyl-beta-xyclodextrin (HBCD) và tùy ý chứa rượu hai hoặc bốn nguyên tử cacbon. Ngạc nhiên, sự kết hợp này đã được chứng minh

là chế phẩm nổi bậc cho việc bảo toàn số lượng, hiệu lực (khả năng gây nhiễm) và chất lượng của adenovirut, nhưng được chứng minh ở đây.

Theo phương án ưu tiên, nồng độ của xitrat nằm trong khoảng giữa 5 mM và 30 mM, ví dụ khoảng giữa 5 mM và 25 mM, ví dụ khoảng giữa 10 mM và 25 mM, ví dụ khoảng 20 mM.

Một thành phần thiết yếu khác trong các chế phẩm này mà góp phần vào sự ổn định virut trong khoảng nhiệt độ lớn và trong khoảng thời gian bảo quản kéo dài là HBCD, mà được sử dụng làm chất bảo vệ đông lạnh. Theo phương án ưu tiên, nồng độ của HBCD nằm trong khoảng giữa 1% (khối lượng/khối lượng) đến 10% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng giữa 3% (khối lượng/khối lượng) đến 8% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng giữa 4% (khối lượng/khối lượng) đến 6% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng 5% (khối lượng/khối lượng).

Thành phần bổ sung của các chế phẩm theo sáng chế là muối. Muối tăng cường tính ổn định virut. Mục đích của việc đưa muối vào trong chế phẩm là để đạt được cường độ ion hoặc nồng độ osmol mong muốn và tối ưu hóa bổ sung các tương tác tĩnh điện. Muối có mặt ở nồng độ osmol mà được chấp nhận về mặt sinh lý với vật chủ. Các đóng góp đối với cường độ ion có thể đến từ các ion được tạo ra bởi các hợp chất đệm cũng như từ các ion của muối không được đệm. Các muối mà thích hợp cho các chế phẩm theo sáng chế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở natri clorua (NaCl), Canxi clorua (CaCl_2) hoặc mangan clorua (MnCl_2). Trái với tình trạng kỹ thuật đã biết, magie clorua (MgCl_2) cho thấy là gây bất lợi cho tính ổn định adenovirut. Do đó, theo phương án ưu tiên chế phẩm theo sáng chế không chứa magie clorua.

Theo phương án ưu tiên, chế phẩm virut theo sáng chế chứa natri clorua (NaCl). Theo phương án ưu tiên, nồng độ của natri clorua nằm trong khoảng giữa 10 mM và 250 mM, ví dụ khoảng giữa 20 mM và 200 mM, ví dụ khoảng giữa 30 mM và 150 mM, ví dụ khoảng giữa 50 mM và 100 mM, ví dụ khoảng 80 mM.

Các chế phẩm theo sáng chế chứa ít nhất một chất tẩy không ion (còn được gọi là chất hoạt động bề mặt không ion) được bổ sung vào để làm giảm sự hút bám vào bề mặt vật chứa cũng như có thể mang lại sự ổn định virut tăng (ví dụ bằng cách làm giảm sự kết cụm). Các chất tẩy không ion để sử dụng trong các chế phẩm theo sáng

chế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở các este axit béo polyoxyetylen sorbitan, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở Polysorbat-80 (Tween 80®), Polysorbat-60 (Tween 60®), Polysorbat-40 (Tween 40®) và Polysorbat-20 (Tween 20®), và loại chất hoạt động bề mặt không ion Pluronic (ví dụ Pluronic 121).

Theo phương án ưu tiên, nồng độ của chất tẩy không ion nằm trong khoảng giữa 0,001% (khối lượng/khối lượng) đến 1% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng giữa 0,005% (khối lượng/khối lượng) đến 0,5% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng giữa 0,01% (khối lượng/khối lượng) đến 0,1% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng giữa 0,01% (khối lượng/khối lượng) đến 0,05% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng giữa 0,015% (khối lượng/khối lượng) đến 0,03% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng 0,025% (khối lượng/khối lượng).

Theo phương án ưu tiên, chế phẩm virus theo sáng chế chứa Polysorbat-80. Nồng độ của Polysorbat-80 tốt hơn nằm trong khoảng giữa 0,001% (khối lượng/khối lượng) đến 1% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng giữa 0,005% (khối lượng/khối lượng) đến 0,5% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng giữa 0,01% (khối lượng/khối lượng) đến 0,1% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng giữa 0,01% (khối lượng/khối lượng) đến 0,05% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng giữa 0,015% (khối lượng/khối lượng) đến 0,03% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng 0,025% (khối lượng/khối lượng).

Theo phương án ưu tiên, chế phẩm virus theo sáng chế còn chứa EDTA. Theo phương án ưu tiên hơn, nồng độ của EDTA nằm trong khoảng giữa 0,05 mM đến 0,2 mM, ví dụ khoảng giữa 0,05 mM đến 0,15 mM, ví dụ khoảng giữa 0,08 mM đến 0,12 mM, ví dụ khoảng 0,1 mM.

Theo một phương án ưu tiên khác, chế phẩm virus theo sáng chế còn chứa etanol. Theo phương án ưu tiên hơn, nồng độ của etanol nằm trong khoảng giữa 0,1% (khối lượng/khối lượng) đến 1% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng giữa 0,2% (khối lượng/khối lượng) đến 0,8% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng giữa 0,2% (khối lượng/khối lượng) đến 0,6% (khối lượng/khối lượng), ví dụ khoảng 0,4% (khối lượng/khối lượng).

Theo phương án ưu tiên, nếu chế phẩm virus theo sáng chế chứa etanol nó không nhất thiết phải chứa EDTA đồng thời.

Trên cơ sở phân thảo luận trên, sáng chế đề cập đến chế phẩm chứa adenovirus, như Ad5, Ad26 hoặc Ad35 tái tổ hợp, mà có thể ví dụ được sử dụng trong liệu pháp gen và/hoặc các ứng dụng dùng vaccine gen, mà cho thấy các đặc tính về tính ổn định được cải thiện so với kết quả các chế phẩm hoạt động tốt nhất được biết trong lĩnh vực này (được bộc lộ trong Evans và cộng sự 2004) và mà ít nhất chứa đệm xitrat, HBCD làm chất bảo vệ đông lạnh, muối, và chất hoạt động bề mặt.

Phương án cụ thể theo sáng chế đề cập đến chế phẩm adenovirus tái tổ hợp mà được đệm bằng xitrat đến pH nằm trong khoảng giữa 5,5 và 6,5, và còn chứa hydroxypropyl-beta-cyclodextrin (HBCD), muối, chất tẩy không ion, và rượu có 2 hoặc 4 nguyên tử cacbon.

Theo phương án ưu tiên theo sáng chế, chế phẩm chứa đệm xitrat với pH nằm trong khoảng pH 5,5 đến pH 6,5, chứa HBCD làm chất bảo vệ đông lạnh, NaCl làm muối, Polysorbat-80 làm chất hoạt động bề mặt và rượu có 2- hoặc 4 nguyên tử cacbon làm chất bảo vệ đông lạnh bổ sung chưa từng có trước đây.

Theo một phương án khác theo sáng chế, chế phẩm chứa đệm xitrat với pH nằm trong khoảng pH 5,5 đến pH 6,5, chứa HBCD làm chất bảo vệ đông lạnh, NaCl làm muối, Polysorbat-80 làm chất hoạt động bề mặt và EDTA.

Theo một phương án ưu tiên khác theo sáng chế, chế phẩm chứa đệm xitrat với pH nằm trong khoảng pH 5,5 đến pH 6,5, chứa HBCD làm chất bảo vệ đông lạnh, NaCl làm muối, Polysorbat-80 làm chất hoạt động bề mặt và etanol làm chất bảo vệ đông lạnh bổ sung chưa từng có trước đây.

Theo một phương án ưu tiên khác theo sáng chế, chế phẩm chứa đệm xitrat với pH nằm trong khoảng pH 5,5 đến pH 6,5, chứa HBCD làm chất bảo vệ đông lạnh, NaCl làm muối, Polysorbat-80 làm chất hoạt động bề mặt. Chế phẩm này còn chứa etanol và không chứa EDTA.

Theo phương án ưu tiên theo sáng chế chế phẩm có pH nằm trong khoảng giữa 5,9 và 6,2, và chứa xitrat ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 10 và 25 mM; HBCD ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 4% (khối lượng/khối lượng) và 6% (khối lượng/khối

lượng); NaCl ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 70 mM và 100 mM; Polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,018% (khối lượng/khối lượng) và 0,035% (khối lượng/khối lượng); và etanol ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,3% (khối lượng/khối lượng) đến 0,45% (khối lượng/khối lượng).

Theo một phương án ưu tiên khác theo sáng chế chế phẩm có độ pH nằm trong khoảng giữa 5,8 và 6,2, và chứa xitrat ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 15 và 25 mM; HBCD ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 3% (khối lượng/khối lượng) và 8% (khối lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 50 mM và 100 mM; Polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,01% (khối lượng/khối lượng) và 0,03% (khối lượng/khối lượng); và EDTA ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,05 mM đến 0,15 mM.

Theo một phương án ưu tiên khác theo sáng chế chế phẩm có độ pH nằm trong khoảng giữa 5,9 và 6,2, và chứa xitrat ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 10 và 25 mM; HBCD ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 4% (khối lượng/khối lượng) và 6% (khối lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 70 mM và 100 mM; Polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,018% (khối lượng/khối lượng) và 0,035% (khối lượng/khối lượng); và EDTA ở nồng độ nằm trong khoảng giữa 0,05 mM đến 0,15 mM.

Theo phương án còn ưu tiên hơn nữa theo sáng chế chế phẩm được đệm bằng khoảng 20 mM xitrat đến pH khoảng 6; HBCD có mặt ở nồng độ khoảng 5% (khối lượng/khối lượng); NaCl có mặt ở nồng độ khoảng 80 mM; chất hoạt động bề mặt là Polysorbat-80 ở nồng độ khoảng 0,025% (khối lượng/khối lượng); và EDTA có mặt ở nồng độ khoảng 0,1 mM.

Theo phương án còn ưu tiên hơn nữa theo sáng chế chế phẩm được đệm bằng khoảng 20 mM xitrat đến pH khoảng 6; HBCD có mặt ở nồng độ khoảng 5% (khối lượng/khối lượng); NaCl có mặt ở nồng độ khoảng 80 mM; chất hoạt động bề mặt là Polysorbat-80 ở nồng độ khoảng 0,025% (khối lượng/khối lượng); và etanol có mặt ở nồng độ khoảng 0,4% (khối lượng/khối lượng). Ngoài ra, tổ hợp của các yếu tố nêu trên có thể được sử dụng.

Theo một phương án các chế phẩm theo sáng chế được chứa trong lọ như ví dụ lọ thủy tinh bosilicat DIN 2R loại I. Theo một phương án khác, các chế phẩm được chứa trong túi. Túi mà chứa các chế phẩm theo sáng chế có thể chứa các lớp được làm bằng ví dụ copolyme Etylen Vinyl Axetat (EVA) hoặc rượu Etyl Vinylic (EVOH). Theo một phương án khác nữa theo sáng chế, các chế phẩm được chứa trong xylanh.

Các chế phẩm virus tái tổ hợp được mô tả ở đây có thể được dùng cho vật chủ có xương sống (tốt hơn là vật chủ là động vật có vú và đặc biệt là đối người nhận là con người) bằng cách thức bất kỳ được biết trong lĩnh vực này. Các đường phân phối này bao gồm nhưng không chỉ giới hạn ở tiêm trong cơ, tiêm trong màng bụng, tiêm trong tĩnh mạch, xông hít hoặc phân phối qua mũi, phân phối qua miệng, dùng dưới lưỡi, dùng dưới da, dùng qua bì, dùng trong bì, dùng trong ống tuyến nước bọt, dùng qua da hoặc dùng dưới da. Theo phương án ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế thích hợp với việc dùng ngoài đường tiêu hóa.

Theo các chế phẩm được bộc lộ ở đây, sáng chế còn đề cập đến các phương pháp bảo quản adenovirus mà bao gồm việc điều chế các chế phẩm chứa virus như được bộc lộ ở đây, các chế phẩm như vậy mà dẫn đến tính ổn định virus tăng khi được bảo quản dưới -65°C và trong khoảng $2-8^{\circ}\text{C}$ và có thể cao hơn trong khi còn thích hợp với việc dùng ngoài đường tiêu hóa, đặc biệt là việc dùng ngoài đường tiêu hóa cho người.

Do đó, một khía cạnh khác theo sáng chế đề cập đến các phương pháp bảo quản adenovirus mà bao gồm việc bào chế chế phẩm được bộc lộ ở đây và bảo quản chế phẩm này ở nhiệt độ nằm trong khoảng giữa 2°C và 8°C .

Các ví dụ sau được đưa ra để minh họa sáng chế, tuy nhiên sáng chế không giới hạn ở đó.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1.

Phương pháp và thiết kế thử nghiệm

Sau khi kiểm tra một vài chế phẩm khác nhau, một chế phẩm hoạt động tốt hơn các chế phẩm còn lại. Chế phẩm mới này được đặt tên là “Chế phẩm B” và chứa 5%

(khối lượng/khối lượng) HBCD, 20 mM xitrat, 0,02% (khối lượng/khối lượng) PS-80 và 75 mM NaCl ở pH 6,0.

Hai mẫu điều chế adenovirut (Ad35.TB-S và Ad26.Mos1.Gag-Pol) (một chứa adenovirut typ huyết thanh 35 (Ad35) và một chứa adenovirut typ huyết thanh 26 (Ad26)) đã được trao đổi có đệm nhờ sử dụng cột PD-10 (GE Healthcare) thành chế phẩm B.

Cả hai mẫu điều chế adenovirut cũng được bào chế thành “chế phẩm đối chứng” mà được mô tả trong Evans và cộng sự 2004 và là chế phẩm tốt nhất từ trước đến nay. “Chế phẩm đối chứng” chứa 10 mM Tris, 10 mM Histidin, 1 mM $MgCl_2$, 75 mM NaCl, 5% (khối lượng/khối lượng) sucroza, 0,02 % (khối lượng/khối lượng) PS-80, 0,1 mM EDTA, 0,4 % (khối lượng/khối lượng) EtOH, ở pH 7,4.

Mỗi chế phẩm, 12 cột được sử dụng; dịch rửa giải được gom lại, lọc vô trùng và bảo quản ở 2-8°C trong chai thủy tinh. Các mẫu được lấy để xác định độ chuẩn virut bằng vp-QPCR và tất cả các độ chuẩn được điều chỉnh bằng dung dịch đệm thích hợp đến $1,7 \times 10^{11}$ vp/mL. Sau đó, các chế phẩm được nạp vào các lọ thủy tinh (0,7 mL mỗi lọ), nút lại và đậy nắp.

Các mẫu $t=0$ (đối chứng, 6 lọ mỗi nhóm) được bảo quản trực tiếp ở $\leq -65^\circ C$. Sau đó, sáu lọ của mỗi nhóm ($n=6$) được ủ ở $25^\circ C$ và đông lạnh ở $\leq -65^\circ C$ ở $t=10, 20, 30, 40, 50, 60, 65, 70, 75, 80$ và 90 ngày cho đến khi phân tích mẫu bằng QPA được thực hiện ba lần mỗi mẫu.

Ngoài ra, các mẫu $t=0$ đối với các vật truyền ở cả hai chế phẩm được phân tích bằng TMA (Thử nghiệm nóng chảy do nhiệt) để xác định nhiệt độ nóng chảy vỏ capsit. Nhiệt độ nóng chảy cao hơn tỉ lệ thuận với tính ổn định nhiệt cao hơn của vỏ capsit virut. Các mẫu điểm cuối ($t=90$ ngày) cũng được phân tích bằng Sắc ký lỏng hiệu năng cao pha ngược (RP-HPLC) và Kết lắng ly tâm chênh lệch (DCS) và so sánh với các đối chứng $t=0$.

Kết quả và kết luận

Sau khi hoàn thành nghiên cứu, tất cả các mẫu được phân tích bằng QPA và sự mất hiệu lực được biểu hiện dưới dạng delta bằng cách trừ các giá trị $t=0$. Chế phẩm B, theo sáng chế (hình thoi rộng) hoạt động tốt hơn đáng kể ($p=1,44E-05$) chế phẩm

đối chứng (hình tròn đặc) dẫn đến sự phân rã ít hơn theo thời gian và thời gian bảo quản dự tính dài hơn (Bảng 1) đối với cả hai adenovirut (Hình 1 và 2). Với Hệ thống phân tích thống kê (phần mềm SAS), mô hình tuyến tính (Ad26) và bình phương (Ad35) được thử trên dữ liệu hiệu lực nhờ sử dụng thời gian và bình phương thời gian làm các kết quả cố định. Trong khi kết quả ‘thời gian’ cố định thể hiện sự giảm tuyến tính ở hiệu lực, kết quả ‘thời gian*thời gian’ cố định thể hiện độ cong của sự giảm này. Cả hai kết quả được sử dụng trong mô hình này để đánh giá ý nghĩa của chúng. Tiêu chuẩn thông tin Akaike (AIC) là phép đo đối với chất lượng tương đối của mô hình thống kê, lưu ý đến độ phức tạp của mô hình và độ chính xác phù hợp của nó. AIC càng nhỏ, sự phù hợp của mô hình càng tốt. Theo mô hình tuyến tính, độ dốc thể hiện tốc độ thoái biến hiệu lực. Bằng cách so sánh các độ dốc, chất đệm tốt nhất (độ dốc thấp nhất) có thể được xác định.

Thời gian bảo quản tương đương với các thời điểm mà được coi là giới hạn dưới của khoảng này theo đặc điểm kỹ thuật cho trước (tức là giảm hiệu lực). Đối với mô hình bình phương, để tính toán thời gian bảo quản, khoảng tin cậy 95% hai bên quanh giá trị trung bình được lấy. Việc chỉ giữ giới hạn dưới để đánh giá thời gian bảo quản tạo ra mức tin cậy 97,5% đối với khoảng tin cậy thấp hơn đơn biến. Các hệ số chặn (phản ánh hiệu lực ở $t=0$) được lấy trung bình và loại bỏ khỏi dữ liệu thô và mô hình. Thời gian bảo quản được tính toán đối với cả hai chế phẩm.

Bảng 1: Thời gian bảo quản ở 25°C thu được từ phân tích thống kê đường cong thoái biến (Hình 1 và Hình 2).

	Chế phẩm B so với đối chứng
Thời gian bảo quản của Ad26	Dài hơn 36,1%
Thời gian bảo quản của Ad35	Dài hơn 50,0%

RP-HPLC không thể hiện dấu hiệu bất kỳ về các cải biến protein Adeno hay oxy hóa. DCS không cho thấy dấu hiệu bất kỳ về sự kết cụm. Hơn thế nữa, chế phẩm theo sáng chế dẫn đến nhiệt độ nóng chảy tăng đáng kể đối với cả Ad26 (Hình 3) và

Ad35 (Hình 4) so với chế phẩm đối chứng, chỉ ra tính ổn định tăng của adenovirut ở chế phẩm B.

Ví dụ 2

Phương pháp và thiết kế thử nghiệm

Sau các thử nghiệm được mô tả trong Ví dụ 1, chế phẩm B được cải biến bằng cách thêm hoặc bớt một hoặc một vài thành phần (NaCl, Etanol, EDTA hoặc tổ hợp của chúng) tạo ra 8 chế phẩm thử nghiệm (A đến H, xem Bảng 2) mà được so sánh với chế phẩm đối chứng (được mô tả trong Evans và cộng sự và được nói rõ ở trên). Tất cả các chế phẩm chứa 5% HBCD, 20 mM xitrat và 0,02% PS-80. Như được chỉ ra trong Bảng 2, các chế phẩm còn bao gồm 75 mM NaCl, 0,1 mM EDTA và/hoặc 0,5% etanol (EtOH). Adenovirut (Ad26) được ủ trong 9 chế phẩm trong 69 ngày ở 25°C hoặc 16 ngày ở 35°C hoặc đưa vào 30 chu kỳ đông lạnh/rã đông tiếp theo là khuấy trộn (1 ngày ở nhiệt độ trong phòng). Sự mất hiệu lực được đánh giá bằng QPA và biểu hiện dưới dạng giá trị Ct (chu kỳ ngưỡng) delta ($t=0$ trừ). Ngoài ra, độ hấp thụ ở 350 nm được đọc dưới dạng số đo độ đục và huỳnh quang nội tại được đo để phát hiện sự thay đổi cấu tạo protein và sự kết cụm. Cuối cùng, TMA và vp-QPCR được thực hiện để xác định nhiệt độ nóng chảy và tỉ lệ vp/IU.

Bảng 2: Thành phần chế phẩm. Tất cả các chế phẩm chứa 5% HBCD, 20 mM xitrat và 0,02% PS-80, một số được bổ sung NaCl:75 mM, EDTA: 0,1 mM và/hoặc etanol (EtOH): 0,5% (khối lượng/khối lượng).

Chế phẩm	NaCl	EDTA	EtOH
A	-	-	-
B	+	-	-
C	-	+	-
D	+	+	-
E	-	-	+
F	+	-	+
G	-	+	+
H	+	+	+

Kết quả và kết luận

Dựa trên các kết quả tính ổn định ở 25 °C thể hiện trên Hình 5, có thể kết luận rằng việc bổ sung NaCl kết hợp với EDTA (C và D) hoặc etanol (E và F) rõ ràng là có lợi cho tính ổn định của virus, trong đó etanol rõ ràng là làm tốt hơn EDTA. Bất ngờ là, tổ hợp của cả EDTA và etanol có hoặc không có NaCl không tạo ra chế phẩm ổn định hơn (G và H). Điều này trái ngược với điều được mong đợi từ tình trạng kỹ thuật đã biết ví dụ Altaras et al, 2005, và Evans và cộng sự 2004 trong đó tổ hợp đặc hiệu của EDTA/EtOH thường được gọi là chất ức chế sự oxy hóa gốc tự do và thêm vào đó là chất tăng cường tốt đối với tính ổn định adenovirus.

Chuyển sang mô hình khắc nghiệt hơn, 35°C trong 16 ngày, khả năng phân biệt trở nên rõ ràng hơn, như có thể thấy trên Hình 6. Rõ ràng là, việc thêm NaCl vào cải thiện tính ổn định và tác dụng có lợi của etanol được xác nhận trên Hình 6. Ngạc nhiên là, tổ hợp của EDTA cùng với etanol, có hoặc không có NaCl, có tác dụng âm tính rõ ràng lên tính ổn định của virus. Điều này là ngược lại với nhận thức thông thường rằng tổ hợp của EDTA/EtOH hoạt động tốt làm chất ức chế sự oxy hóa gốc tự do (ví dụ Altaras và cộng sự 2005, và Evans và cộng sự 2004). Tóm lại, cả hai yếu tố căng thẳng nhiệt độ cho thấy tác dụng có lợi của NaCl kết hợp với EDTA hoặc etanol trong chế phẩm cụ thể này.

Để khảo sát hiệu quả của các chế phẩm có đường thoái hóa khác nhau, các chế phẩm này (A đến H) được đưa và chu kỳ đông lạnh/rã đông và căng thẳng khuấy trộn (Hình 7). Các hiệu quả quan sát được đều rõ ràng và ngoài mong đợi. Rõ ràng là, EDTA (C và D) không có tác dụng bất kỳ nào. Mặt khác, etanol bảo vệ mạnh mẽ khỏi tổn hại do đông lạnh/rã đông và do đó hoạt động như chất bảo vệ đông lạnh (E đến H).

Các kết quả ngoài dự đoán này đã được xác nhận bằng các số đo độ hấp thụ ở 350 nm trong thử nghiệm đo độ đục (Hình 8). Việc đông lạnh/rã đông (ô vuông rỗng trên Hình 8) dẫn đến sự giảm độ đục so với $t=0$, trong các chế phẩm mà không có etanol. Sự giảm này là phù hợp nhất do sự phân rã của các hạt virus. Phù hợp với các quan sát này, căng thẳng nhiệt độ tăng cao (hình tam giác màu đen trên Hình 8) còn tạo ra sự giảm độ đục ở các chế phẩm không chứa etanol, trong khi đó chế phẩm có

etanol, đặc biệt là chế phẩm F, không thể hiện thay đổi đáng kể so với các mẫu $t=0$ (vòng tròn đen trên Hình 8).

Ngoài ra, huỳnh quang nội tại (Hình 9) còn xác nhận các quan sát trước đây. Chế phẩm mà không có etanol dẫn đến sự giảm đáng kể ở huỳnh quang tryptophan sau căng thẳng đông lạnh/rã đông so với $t=0$ (hình vuông rỗng trên Hình 9) chỉ ra một vài thay đổi hình dạng ở vỏ capsit của virus. Ngược lại rõ ràng, các chế phẩm có etanol bảo vệ virus khỏi yếu tố căng thẳng này. Căng thẳng nhiệt độ chỉ có tác động nhỏ lên các chế phẩm chứa etanol.

Dữ liệu TMA biểu thị nhiệt độ nóng chảy tăng đáng kể của chế phẩm F so với chế phẩm đối chứng (Hình 10), điều này chỉ báo vỏ capsit virus ổn định hơn trong chế phẩm F.

Quan trọng là, tỉ lệ vp/IU, phản ánh tỉ lệ gây nhiễm của dạng điều chế virus (chỉ báo chất lượng của hạt virus), biểu thị các giá trị cao hơn (ít hạt gây nhiễm trên mỗi lượng tổng của hạt) trong chế phẩm đối chứng so với chế phẩm F sau khi tiếp xúc với nhiệt độ tăng cao (25°C), xem Bảng 3. Điều này thể hiện rằng chế phẩm F có khả năng bảo toàn khả năng gây nhiễm của adenovirus theo cách tốt hơn nhiều so với chế phẩm đối chứng.

Bảng 3: tỉ lệ vp/IU đối với chế phẩm F và chế phẩm đối chứng ở $t=0$ và $t=61$ ở 25°C

	Không có căng thẳng	Có căng thẳng
Chế phẩm đối chứng	39	93
Chế phẩm F	32	61

Ví dụ 3.

Phương pháp và thiết kế thử nghiệm

Để xác định không gian thiết kế đệm của chế phẩm, khoảng mạnh đối với mỗi tá dược được đánh giá. Sau khi chọn lọc các yếu tố, khoảng thử nghiệm được xác định cho mỗi thành phần như báo cáo trong Bảng 4.

Thực hiện theo phương thức thiết kế của thử nghiệm (DOE) sắp xếp không gian thử nghiệm. Nhờ sử dụng thiết kế với mức độ thấp và cao đối với mỗi trong sáu

yếu tố (Bảng 4), 15 chế phẩm được điều chế – bao gồm ba điểm trung tâm – để nghiên cứu tác động của mỗi yếu tố và các tương tác có thể có giữa các yếu tố này (Bảng 5) với khả năng thống kê cao.

Bảng 4: Các yếu tố và mức độ được sử dụng để tạo ra không gian thử nghiệm cho nghiên cứu

Yếu tố đậm chế phẩm F		Đậm chế phẩm mức đích F	Mức thấp	Mức cao
Thành phần đậm	pH	6,0	5,8	6,2
	Xitrat (mM)	20	10	25
	HBCD (khối lượng/khối lượng)	5	3	6
	EtOH (khối lượng/khối lượng)	0,4	0,3	0,5
	PS-80 (khối lượng/khối lượng)	0,02	0,015	0,04
	NaCl (mM)	75	50	100

Bảng 5. Thiết kế thử nghiệm. Mười lăm chế phẩm được điều chế độc lập, bao gồm ba điểm trung tâm (mũi tên xám), theo các yếu tố và mức sử dụng để tạo ra không gian thử nghiệm cho nghiên cứu.

Tên nhóm	pH	Xitrat	HBCD	EtOH	PS-80	NaCL	Chú thích
F-01	6,2	20	3	0,5	0,04	50	
F-02	5,8	25	3	0,3	0,04	75	
F-00,1	6	20	5	0,4	0,02	75	điểm trung tâm
F-03	6	10	3	0,3	0,015	50	
F-00,2	6	20	5	0,4	0,02	75	điểm trung tâm
F-04	6	25	6	0,5	0,04	100	
F-00,3	6	20	5	0,4	0,02	75	điểm trung tâm
F-05	6,2	25	6	0,3	0,02	50	
F-06	5,8	10	6	0,4	0,04	50	
F-07	6,2	10	6	0,5	0,015	75	
F-08	5,8	10	3	0,5	0,02	100	
F-09	6,2	25	3	0,4	0,015	100	
F-10	5,8	20	6	0,3	0,015	100	
F-11	5,8	25	5	0,5	0,015	50	
F-13	6,2	10	5	0,3	0,04	100	

Để đánh giá các mức thích hợp đối với mỗi tá dược và pH (độ mạnh của chế phẩm), mỗi nhóm được nạp vào các lọ thủy tinh và cho qua 10 chu kỳ đông lạnh/rã đông (F/T), tiếp theo là 1 ngày khuấy trộn ở 200 vòng/phút ở nhiệt độ trong phòng (RT) và bảo quản trong 7 ngày ở 35°C (mô hình tăng thoái biến). Sau đó, hiệu lực theo QPA (n=3) được sử dụng làm kết quả.

Dạng điều chế Ad26 được trao đổi đệm nhờ sử dụng các cột PD-10 (GE Healthcare) thành mỗi trong các chế phẩm liệt kê trong Bảng 5. Dịch rửa giải của mỗi chế phẩm được gom lại, lọc vô trùng và bảo quản ở 2-8°C trong chai thủy tinh. Các mẫu được lấy để xác định độ chuẩn virus bằng vp-QPCR và tất cả các độ chuẩn được điều chỉnh bằng chế phẩm thích hợp về 1×10^{11} vp/mL. Sau đó, các chế phẩm được nạp vào lọ thủy tinh (0,75 mL mỗi lọ), nút lại và đậy nắp. Các mẫu t=0 (đối chứng, 6 lọ mỗi nhóm) được bảo quản trực tiếp ở $\leq -65^\circ\text{C}$. Sau đó, bốn lọ mỗi nhóm (n=4) được ủ, đông lạnh/rã đông, khuấy và bảo quản ở 35°C trong 7 ngày (Bảng 6) cho đến khi phân tích mẫu bằng QPA được thực hiện ba lần mỗi mẫu.

Kết quả và kết luận

Sau khi hoàn thành thử nghiệm, các mẫu được phân tích bằng QPA và sự mất hiệu lực được biểu hiện dưới dạng delta bằng cách trừ đi các giá trị t=0. Dữ liệu này được sử dụng cho phân tích thống kê.

Kết quả của phân tích thống kê là xác suất thành công, trong đó thành công được định nghĩa là chế phẩm ổn định, đáp ứng các tập hợp đặc điểm kỹ thuật đối với thuộc tính chất lượng tối hạn được chọn (CQA): hiệu lực. Kiểm tra tương đương được tiến hành giữa T0 và sau căng thẳng: để so sánh sự tương đương, các tiêu chuẩn chấp nhận được xác định trên sự mất hiệu lực tối đa (IU/mL) mà có thể chịu được: trong thử nghiệm này sự mất hiệu lực chịu được được xác định là Δ Giới hạn hiệu lực $\geq -0,30$ lôga IU/mL.

Dữ liệu thử nghiệm thu được được thể hiện trên Bảng 6 và được dùng để làm giảm vùng thử nghiệm và tính không gian thiết kế, dựa trên hiệu lực.

Dữ liệu này bao gồm 45 quan sát. Có 12 đệm khác nhau mà được thử nghiệm làm ba lần và một đệm nữa được điều chế ba lần riêng biệt và mỗi dạng điều chế độc lập được thử nghiệm trong ba lần (các điểm trung tâm).

Bảng 6: Các giá trị thử nghiệm đối với mỗi chế phẩm được thể hiện dưới dạng Δ Hiệu lực (log_IU/mL)

Tên nhóm	Δ Hiệu lực(log_IUpemL)	Chú thích
F-01	-0,35	
F-01	-0,29	
F-01	-0,33	
F-02	-0,29	
F-02	-0,29	
F-02	-0,32	
F-00,1	-0,28	ĐIỂM TRUNG TÂM
F-00,1	-0,27	ĐIỂM TRUNG TÂM
F-00,1	-0,26	ĐIỂM TRUNG TÂM
F-03	-0,3	
F-03	-0,33	
F-03	-0,24	
F-00,2	-0,2	ĐIỂM TRUNG TÂM
F-00,2	-0,28	ĐIỂM TRUNG TÂM
F-00,2	-0,22	ĐIỂM TRUNG TÂM
F-04	-0,18	
F-04	-0,26	
F-04	-0,24	
F-00,3	-0,21	ĐIỂM TRUNG TÂM
F-00,3	-0,18	ĐIỂM TRUNG TÂM
F-00,3	-0,16	ĐIỂM TRUNG TÂM
F-05	-0,2	
F-05	-0,18	
F-05	-0,2	
F-06	-0,33	

F-06	-0,25	
F-06	-0,25	
F-07	-0,18	
F-07	-0,27	
F-07	-0,14	
F-08	-0,31	
F-08	-0,28	
F-08	-0,25	
F-09	-0,28	
F-09	-0,26	
F-09	-0,2	
F-10	-0,27	
F-10	-0,26	
F-10	-0,26	
F-11	-0,31	
F-11	-0,27	
F-11	-0,25	
F-13	-0,22	
F-13	-0,15	
F-13	-0,18	

Mô hình sau đã được khớp với dữ liệu:

$\text{delta_log_potency}[i] \sim \text{normal}(\mu[i], \sigma);$

for(i in 1:Nobs){

$\mu[i] <- \alpha_0 +$

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

$\alpha_{\text{Xitrat}} * \text{Xitrat}[i] +$

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

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

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

$\alpha_{\text{NaCl}} * \text{NaCl}[i] +$
 $\alpha_{\text{HBCD2}} * \text{HBCD}[i] * \text{HBCD}[i] +$
 $\alpha_{\text{PS}_802} * \text{PS}_{80}[i] * \text{PS}_{80}[i] +$
 $\alpha_{\text{pH_HBCD}} * \text{pH}[i] * \text{HBCD}[i] +$
 $\alpha_{\text{pH_NaCl}} * \text{pH}[i] * \text{NaCl}[i] +$
 $\alpha_{\text{r_Batch}}[\text{batch}[i]];$

Trong đó mỗi α -r-batch biểu diễn đợt ngẫu nhiên và xích ma sai số dư.

Để có được các dự báo từ mô hình để có được sự tiếp cận không gian thiết kế dựa trên nguy cơ, khung làm việc Bayesian được sử dụng vì sự phân bố khớp dự báo của CQA được cho các thông số chế phẩm có thể thu được dễ dàng (xem Peterson và cộng sự và Lebrun và cộng sự). Không gian thiết kế dựa trên nguy cơ được xác định nhờ sử dụng biểu xác suất sau:

$$\text{Không gian thiết kế} = \{\tilde{x} \in \chi \mid P(\text{CQAs} \in \Lambda \mid \mathbf{X} = \tilde{x}, \text{dữ liệu}) \geq \pi\}$$

Nói cách khác, không gian thiết kế là vùng thuộc vùng thử nghiệm (thường gọi là không gian nhận thức) trong đó xác suất hậu nghiệm mà các CQA là ở trong đặc tính kỹ thuật (Λ), là cao hơn mức chất lượng xác định, cho trước dữ liệu quan sát được. Ký hiệu này làm ẩn sự bao hàm tính bất định bao gồm trong mô hình thống kê này. Xác suất là số đo trực tiếp sự bảo đảm đáp ứng các đặc điểm kỹ thuật đồng thời. Để tính toán xác suất này, các mô hình thống kê có thể được viết dưới dạng phương trình tuyến tính chung sau. Đối với j^{th} CQA, mô hình được điều chỉnh:

$$\mathbf{y}_i = \mathbf{X}\mathbf{b}_i + \mathbf{c}_i, \text{ với } \mathbf{e}_i \sim N(0, \sigma_i^2) \quad (2)$$

trong đó $\mathbf{y}_i$ là biến đổi bất kỳ áp dụng cho i^{th} CQA để thu được đặc tính thống kê tốt (ví dụ tính đồng nhất, biến đổi lôga hoặc logit), $i = 1, \dots, 7$. Các thông số mô hình $\mathbf{b}_i$ và σ_i^2 cần được ước tính (xem các mục trên).

Xác suất hậu nghiệm của Phương trình (1) được tính từ phân bố dự đoán của các đáp ứng mới, được nhận biết dưới dạng phân bố Student sau (các chỉ số i được làm giảm để đơn giản):

$$\tilde{\mathbf{y}} \mid \tilde{\mathbf{x}}, \text{ dữ liệu} \sim t_{n-p}(\tilde{\mathbf{x}}\hat{\boldsymbol{\beta}}, S) \quad (3)$$

Phân bố Student ba thông số này có $n - p$ bậc tự do (đối với n quan sát và p thông số mô hình), được lấy tâm trên đường hồi quy trung bình $\bar{x}\hat{\beta}$, được tính từ ước tính bình phương nhỏ nhất thông thường của β : $\hat{\beta} = (X'X)^{-1}X'y$.

$S = a \cdot (1 + \bar{x}'(X'X)^{-1}\bar{x})$, trong đó thông số a là tổng bình phương phần dư, tức là, $a = (y - X\hat{\beta})'(y - X\hat{\beta})$. Do đó, S định rõ quy mô của phân bố Student. Hàm ước lượng phương sai được tính là $S/(n - p)$.

Để khảo sát vùng thử nghiệm, không khuyến nghị tạo hệ thống lưới trên 5 hệ số (vì vấn đề thứ nguyên: nếu 2 mức trên mỗi hệ số được đánh giá, sẽ tạo ra hệ thống lưới cỡ 25; nếu 10 mức trên mỗi hệ số, sẽ tạo ra hệ thống lưới cỡ 105, v.v.). Thay vào đó, nhiều mẫu ngẫu nhiên được tạo ra và khảo sát như sau:

a) Chọn các điều kiện thử nghiệm ngẫu nhiên số lượng cao (được phân bố đồng nhất trên x) điều kiện làm việc (thiết lập yếu tố) $\hat{x}_i$ trong vùng thử nghiệm

b) Đối với mỗi điều kiện làm việc: thực hiện số lượng mô phỏng cao:

Vẽ n^* các mẫu $\tilde{y}_{ij} | \hat{x}_i$, dữ liệu ($i = 1, \dots, n^*$) từ phân bố dự đoán như trong phương trình (3), đối với mỗi CQA

c) Từ các mô hình khác nhau của dự báo CQA, tính tỉ lệ của các mẫu nằm trong các đặc điểm kỹ thuật

Tỉ lệ này là ước tính xác suất hậu nghiệm để đạt được các kết quả chất lượng dựa trên các Thuộc tính chất lượng tới hạn và các đặc điểm kỹ thuật của chúng. Cuối cùng, đề xuất là đánh giá bằng mắt sự phân bố làm việc ngẫu nhiên trên các sơ đồ cặp của phép chiếu các kết quả trong không gian hai chiều, để xác định không gian thiết kế (Hình 11)

Các phép tính sau đó được làm thích ứng và các khoảng hệ số được giảm để tối đa hóa xác suất thành công đối với hiệu lực CQA trong các khoảng này (Bảng 7), mà phản ánh cái gọi là Khoảng làm việc bình thường (NOR) và không gian thiết kế. Các khoảng được thể hiện trong Bảng 7 bảo đảm khả năng thành công cao nhất để có chế phẩm ổn định. Do đó các khoảng này bảo đảm tính ổn định tối ưu của sản phẩm.

Bảng 7. Không gian thiết kế với các khoảng yếu tố chọn lọc (NOR)

Yếu tố chế phẩm	Đặc tính kỹ thuật
pH	5,9-6,2
Xitrat (mM)	10-25
HBCD (khối lượng/khối lượng)	4-6
EtOH (khối lượng/khối lượng)	0,3-0,45
PS-80 (khối lượng/khối lượng)	0,018-0,035
NaCl (mM)	70-100

Tài liệu tham khảo

- Altaras N E et al. "Production and formulation of adenovirus vectors", *Advances in biochemical engineering*, Springer, Berlin, DE, vol. 99, 1 November 2005.
- Box, G. E., Hunter, W.G., Hunter, J.S., Hunter, W.G., "Statistics for Experimenters: Design, Innovation, and Discovery", 2nd Edition, Wiley, 2005.
- Bustin et al. 2009, "The MIQE Guidelines", *Clinical Chemistry* 55:4.
- Evans RK, Nawrocki DK, Isopi LA, Williams DM, Casimiro DR, Chin S, Chen M, Zhu DM, Shiver JW, Volkin DB. "Development of stable liquid formulations for adenovirus-based vaccines", *J Pharm Sci*. 2004 Oct;93(10):2458-75.
- Lebrun et al., *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 23: 1330–1351, 2013.
- Peterson J.J., *Journal of Biopharmaceutical Statistics*, 18:959–975, 2008.
- Radosevic K, Rodriguez A, Lemckert AA, van der Meer M, Gillissen G, Warnar C, von Eyben R, Pau MG, Goudsmit J. The Th1 immune response to *Plasmodium falciparum* circumsporozoite protein is boosted by adenovirus vectors 35 and 26 with a homologous insert. *Clin Vaccine Immunol*. 2010 Nov;17(11):1687-94.
- Renteria S S et al. "Development of a nasal adenovirus-based vaccine: Effect of concentration and formulation on adenovirus stability and infectious titer during actuation from two delivery devices" *Vaccine*, vol. 28, no.9, 25 February 2010.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Chế phẩm dạng lỏng chứa adenovirut chứa:
 - a) adenovirut tái tổ hợp;
 - b) đệm xitrat;
 - c) hydroxypropyl-beta-xyclodextrin (HBCD);
 - d) muối;
 - e) chất tẩy không ion;
 trong đó chế phẩm này có độ pH nằm trong khoảng từ 5,5 đến 6,5.
2. Chế phẩm theo điểm 1, trong đó nồng độ xitrat nằm trong khoảng từ 5 mM đến 30 mM.
3. Chế phẩm theo điểm 1 hoặc 2, trong đó nồng độ của HBCD nằm trong khoảng từ 1% (khối lượng/khối lượng) đến 10% (khối lượng/khối lượng).
4. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó muối là natri clorua.
5. Chế phẩm theo điểm 4, trong đó nồng độ của natri clorua nằm trong khoảng từ 20 mM đến khoảng 200 mM.
6. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó chất tẩy không ion là Polysorbat-80.
7. Chế phẩm theo điểm 6, trong đó nồng độ Polysorbat-80 nằm trong khoảng từ 0,005% (khối lượng/khối lượng) đến 0,5% (khối lượng/khối lượng).
8. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó chế phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ 5,7 đến 6,3, và chứa xitrat ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 30 mM; HBCD ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1% (khối lượng/khối lượng) đến 10% (khối lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ nằm trong khoảng từ 20 mM đến 200 mM; Polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01% (khối lượng/khối lượng) đến 0,05% (khối lượng/khối lượng).
9. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 8, trong đó chế phẩm này còn chứa rượu có 2 hoặc 4 nguyên tử cacbon.
10. Chế phẩm theo điểm 9, trong đó rượu có 2 hoặc 4 nguyên tử cacbon là etanol.

11. Chế phẩm theo điểm 10, trong đó nồng độ etanol nằm trong khoảng từ 0,1% (khối lượng/khối lượng) đến 1% (khối lượng/khối lượng).

12. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó chế phẩm có độ pH nằm trong khoảng từ 5,7 đến 6,3, và chứa xitrat ở nồng độ nằm trong khoảng từ 5 đến 30 mM; HBCD ở nồng độ nằm trong khoảng từ 1% (khối lượng/khối lượng) đến 10% (khối lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ nằm trong khoảng từ 20 mM đến 200 mM; Polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,01% (khối lượng/khối lượng) đến 0,05% (khối lượng/khối lượng); và etanol ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,2% (khối lượng/khối lượng) đến 0,6% (khối lượng/khối lượng).

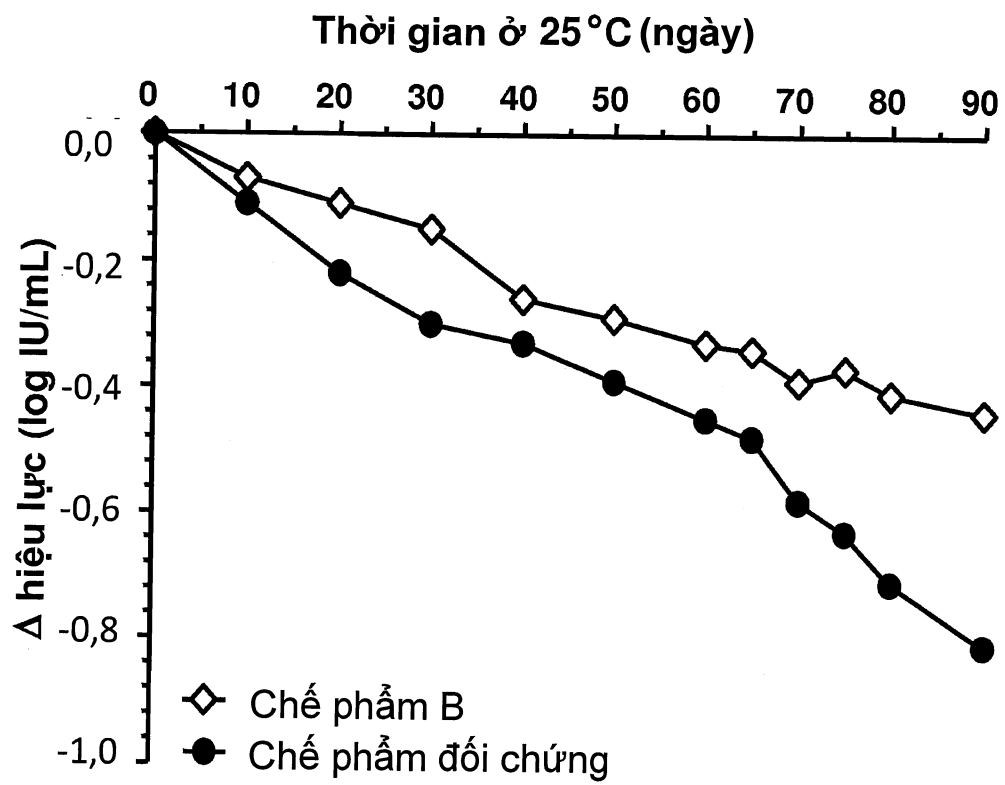
13. Chế phẩm theo điểm 12, trong đó chế phẩm có độ pH là 6, và chứa xitrat ở nồng độ là 20 mM; HBCD ở nồng độ là 5% (khối lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ là 80 mM, Polysorbat-80 ở nồng độ là 0,025% (khối lượng/khối lượng) và etanol ở nồng độ là 0,4% (khối lượng/khối lượng).

14. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 10 đến 12, trong đó chế phẩm có pH nằm trong khoảng từ 5,9 đến 6,2, và chứa xitrat ở nồng độ nằm trong khoảng từ 10 đến 25 mM; HBCD ở nồng độ nằm trong khoảng từ 4% (khối lượng/khối lượng) đến 6% (khối lượng/khối lượng); NaCl ở nồng độ nằm trong khoảng từ 70 mM đến 100 mM; Polysorbat-80 ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,018% (khối lượng/khối lượng) đến 0,035% (khối lượng/khối lượng); và etanol ở nồng độ nằm trong khoảng từ 0,3% (khối lượng/khối lượng) đến 0,45% (khối lượng/khối lượng).

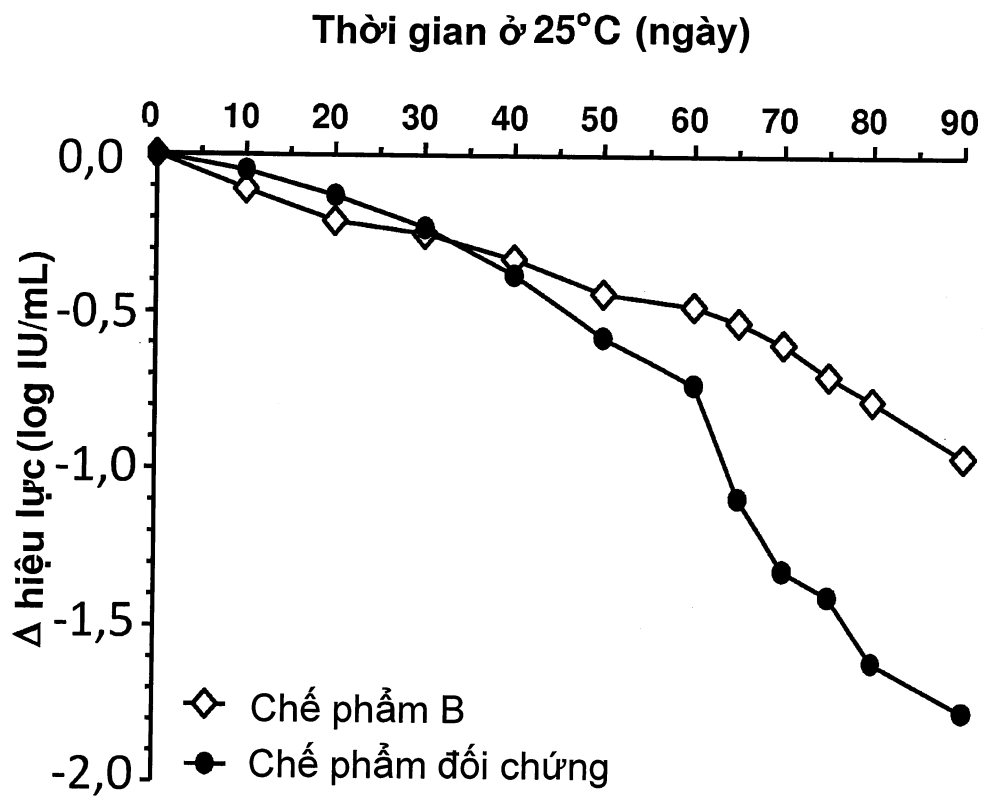
15. Chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 14, trong đó chế phẩm này là thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hóa.

16. Phương pháp bảo quản adenovirut mà bao gồm việc bào chế chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15.

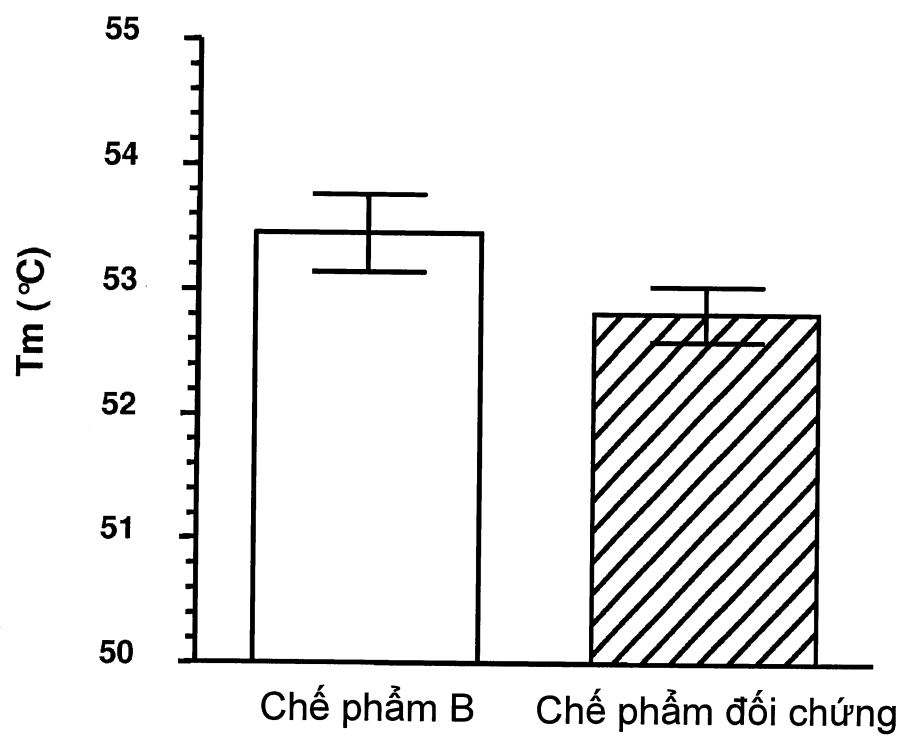
17. Phương pháp bảo quản adenovirut mà bao gồm việc bào chế chế phẩm theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15 và lưu trữ chế phẩm ở nhiệt độ nằm trong khoảng từ 2°C đến 8°C.

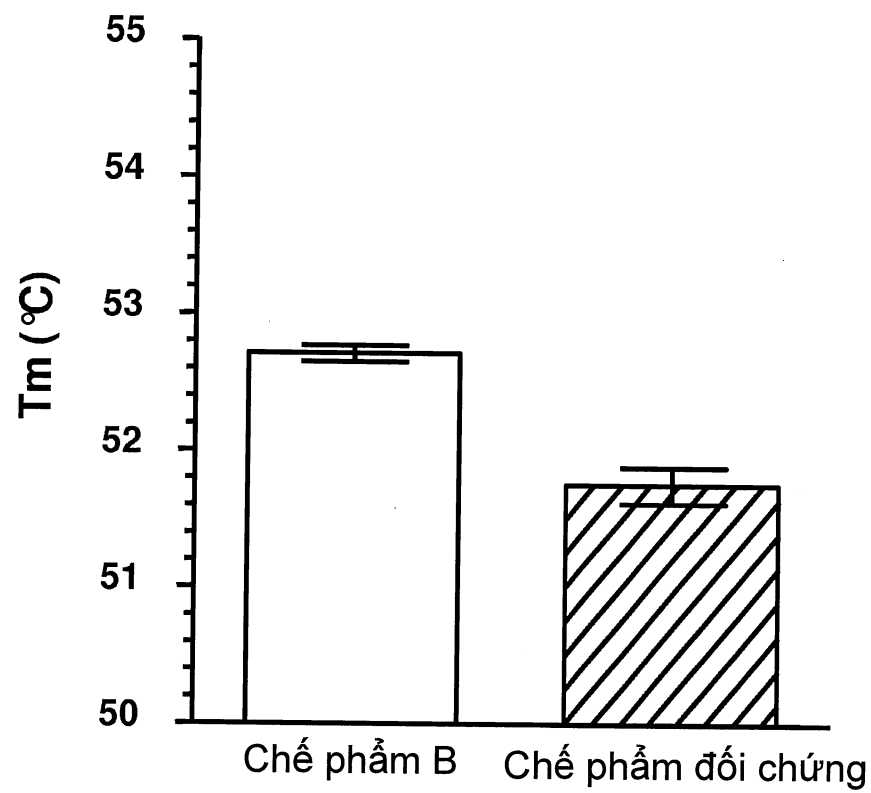


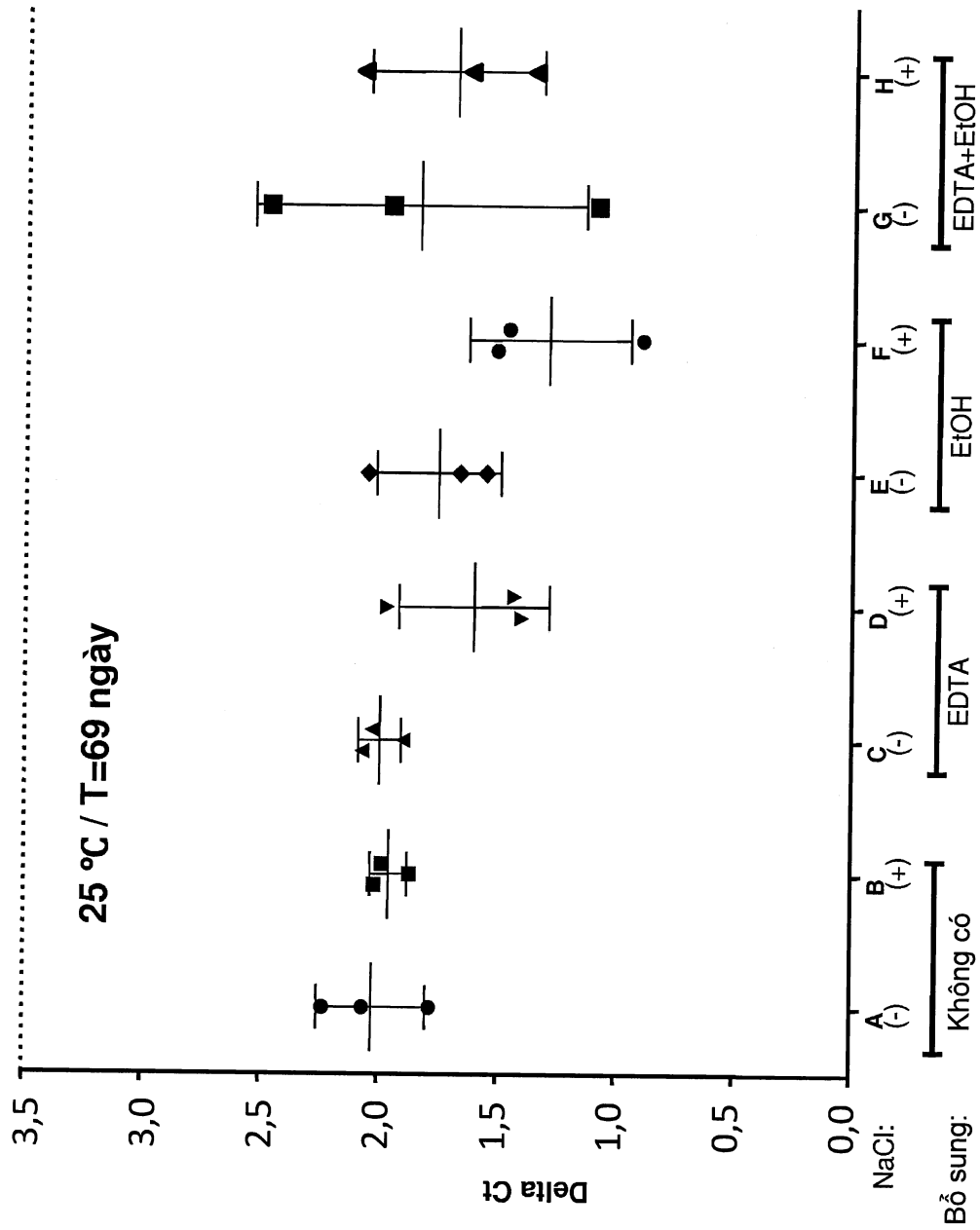
Hình 1



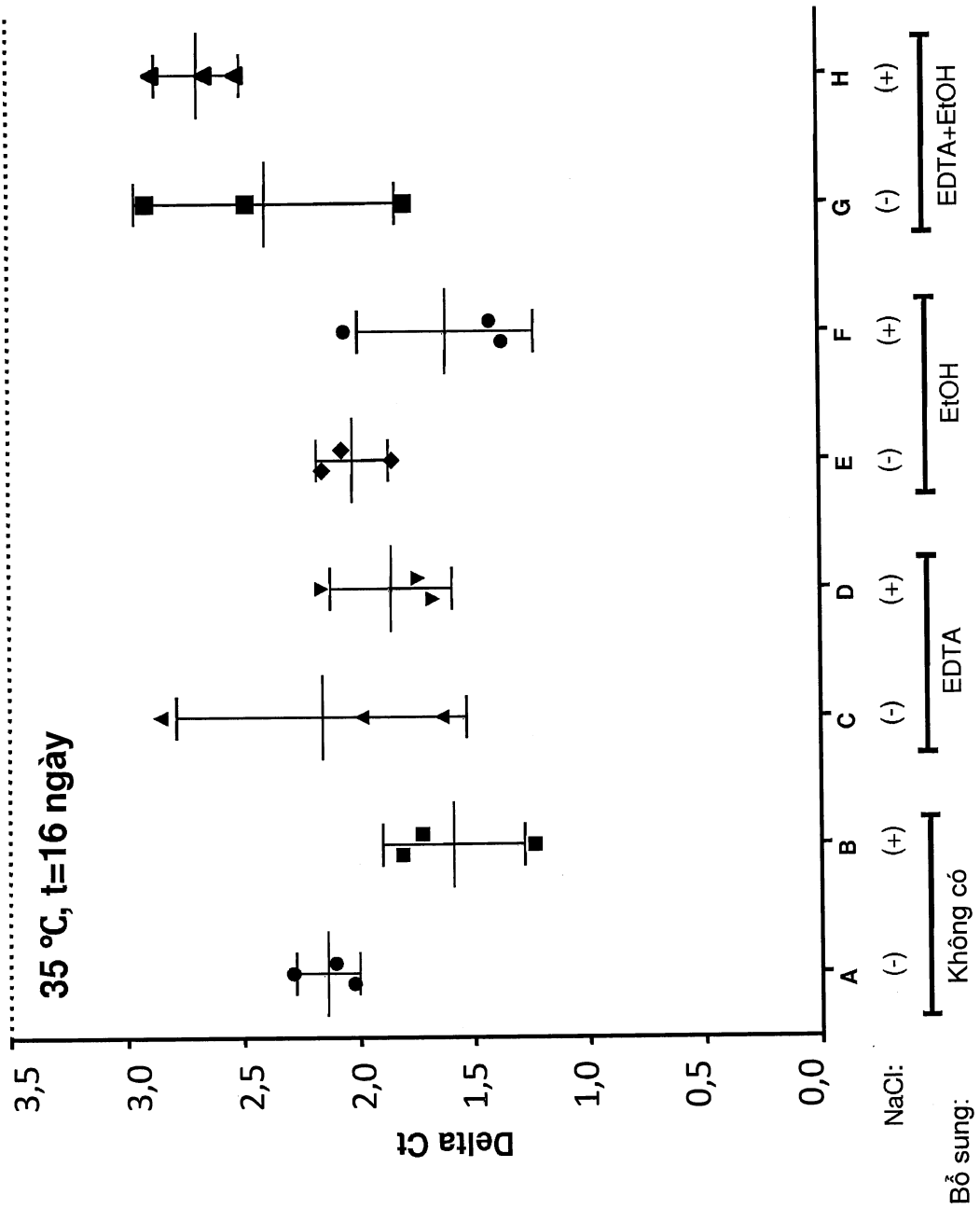
Hình 2

**Hình 3**

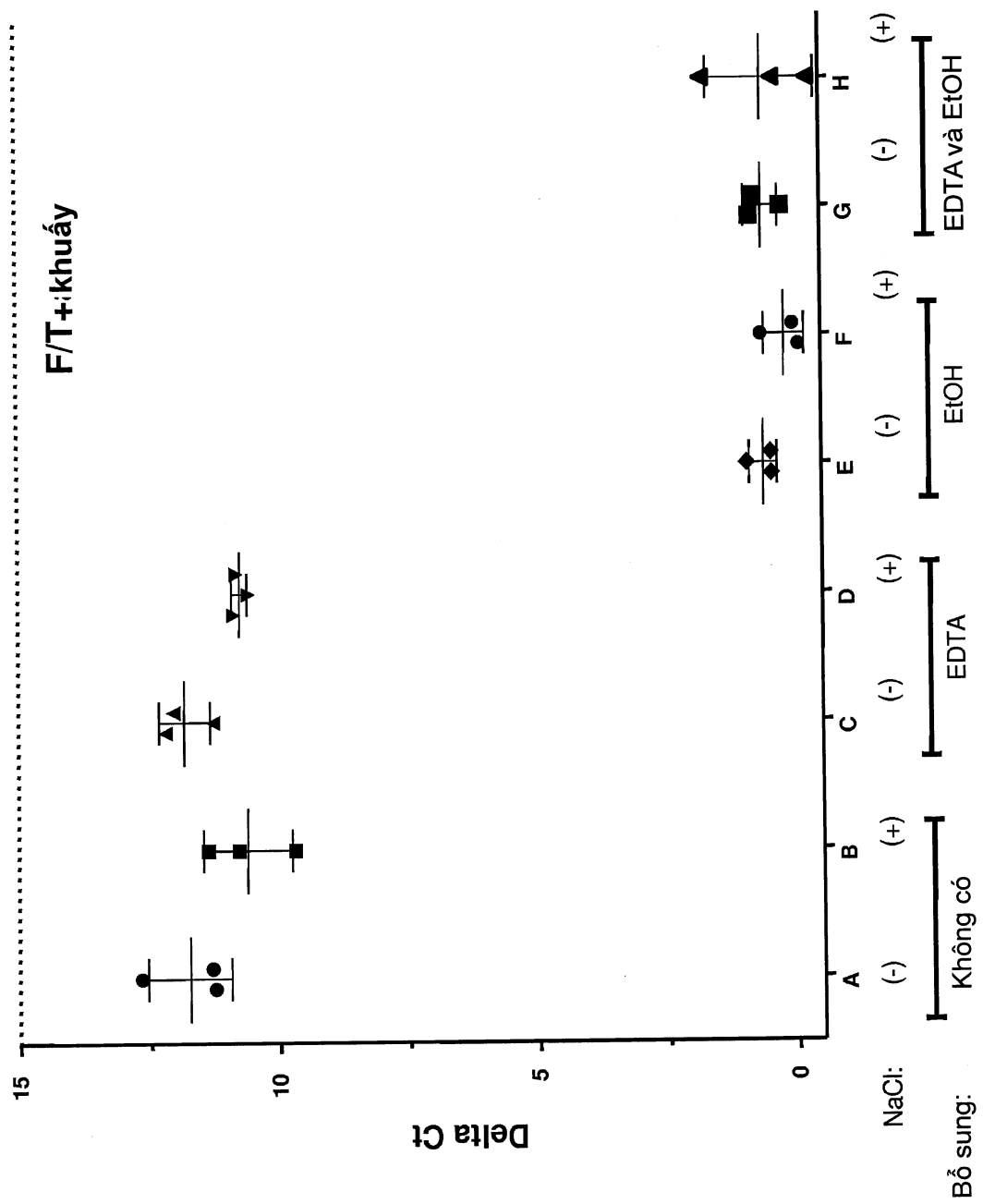
**Hình 4**



Hình 5

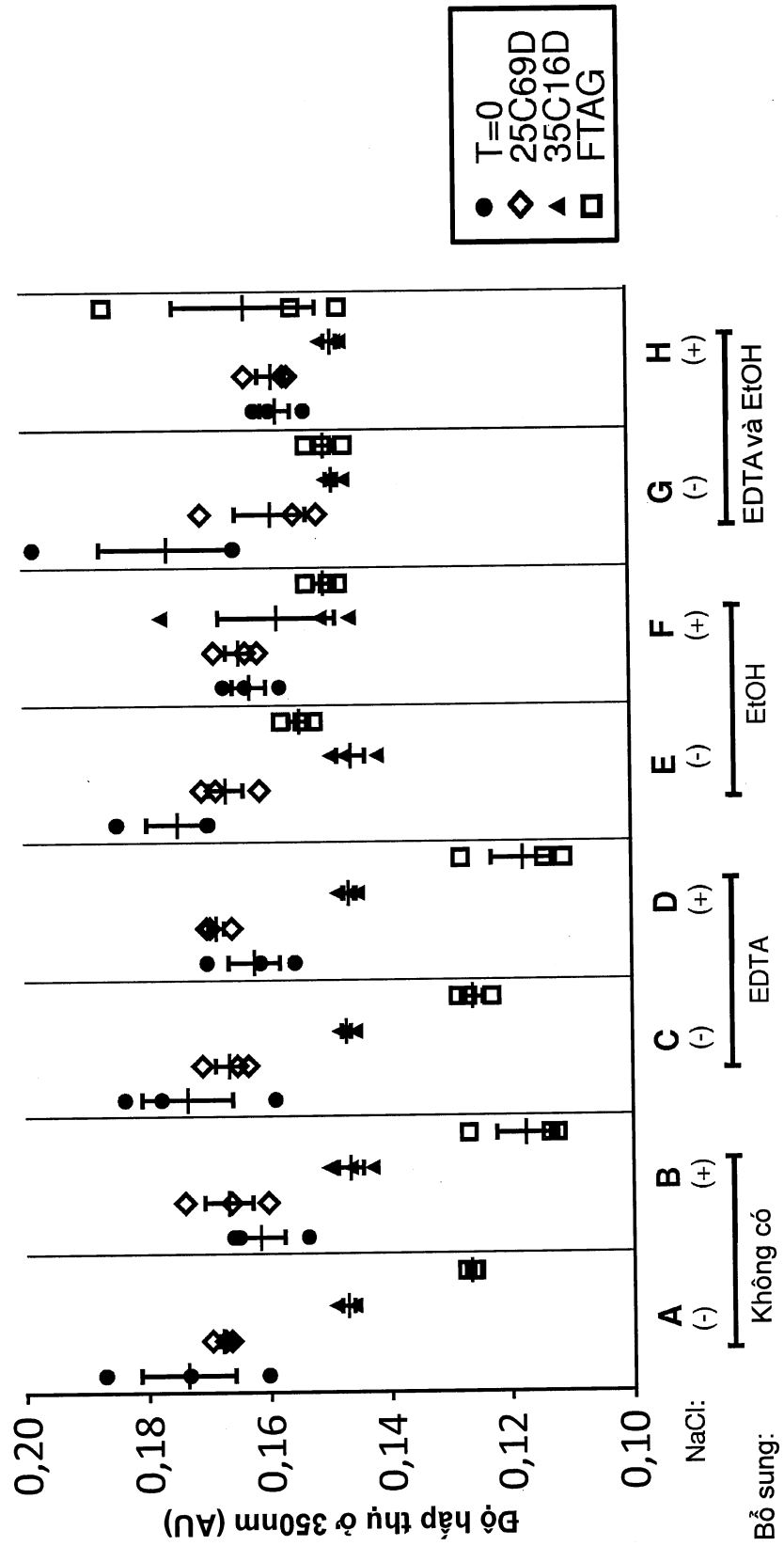


Hình 6

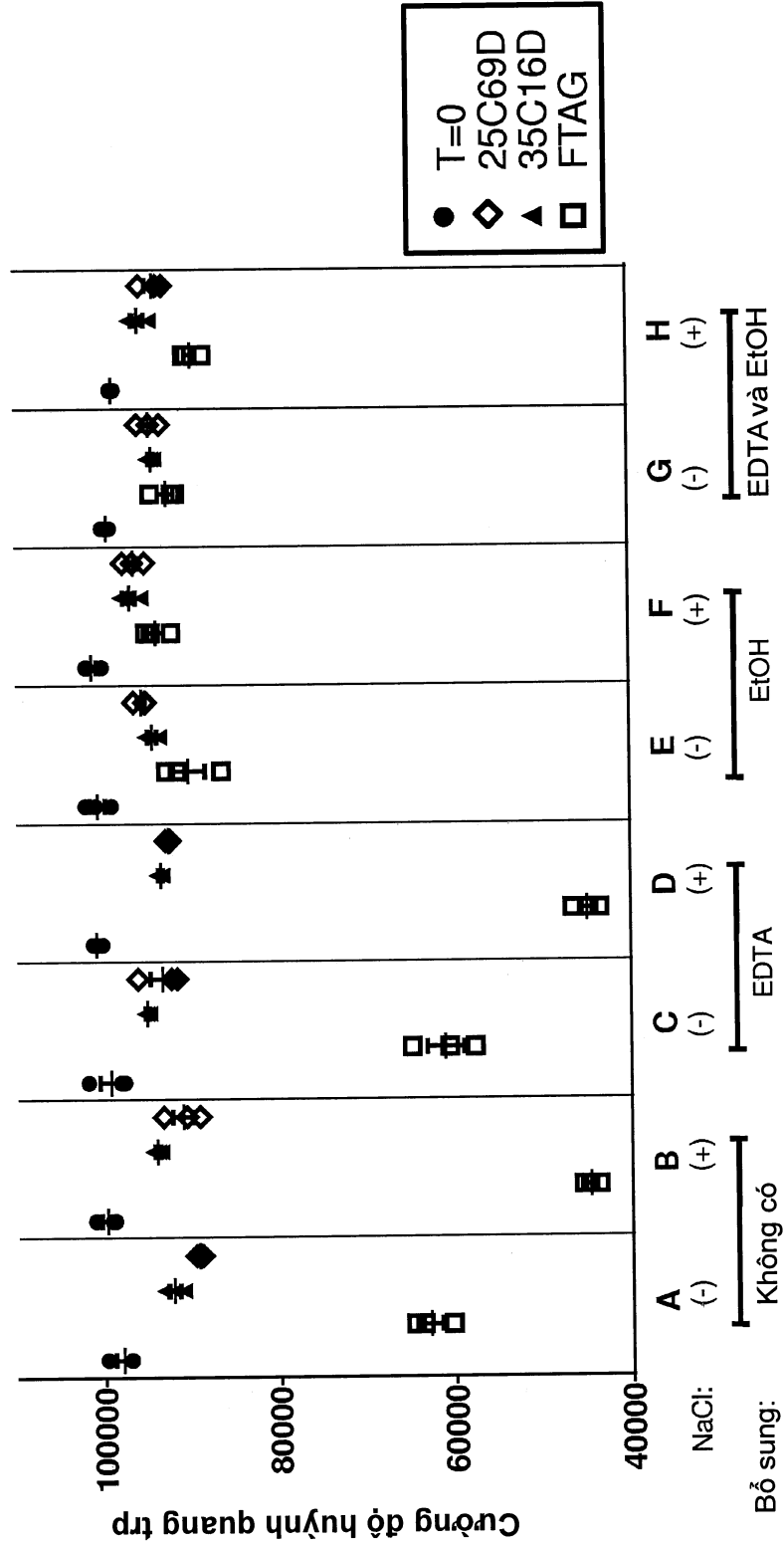


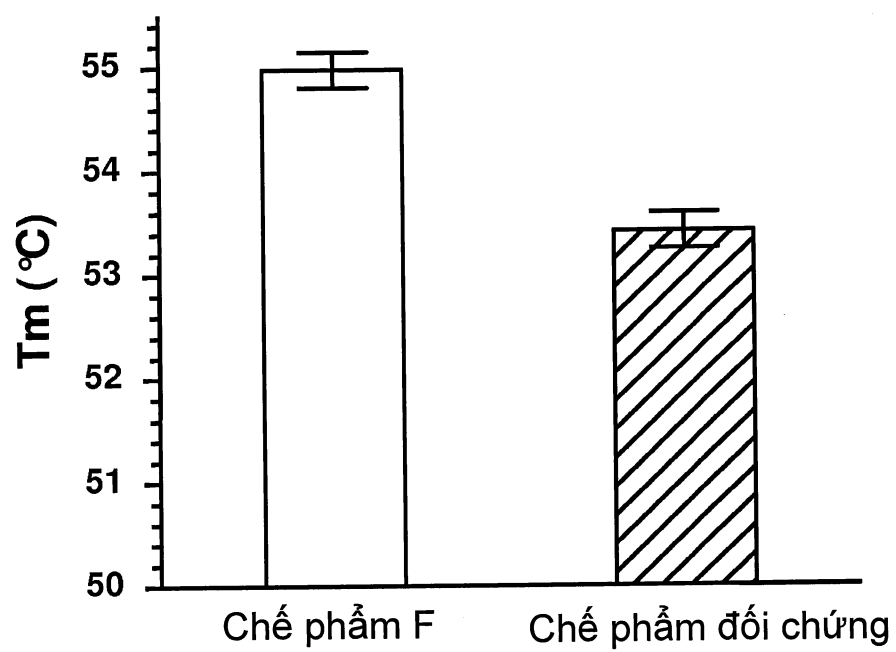
Hình 7

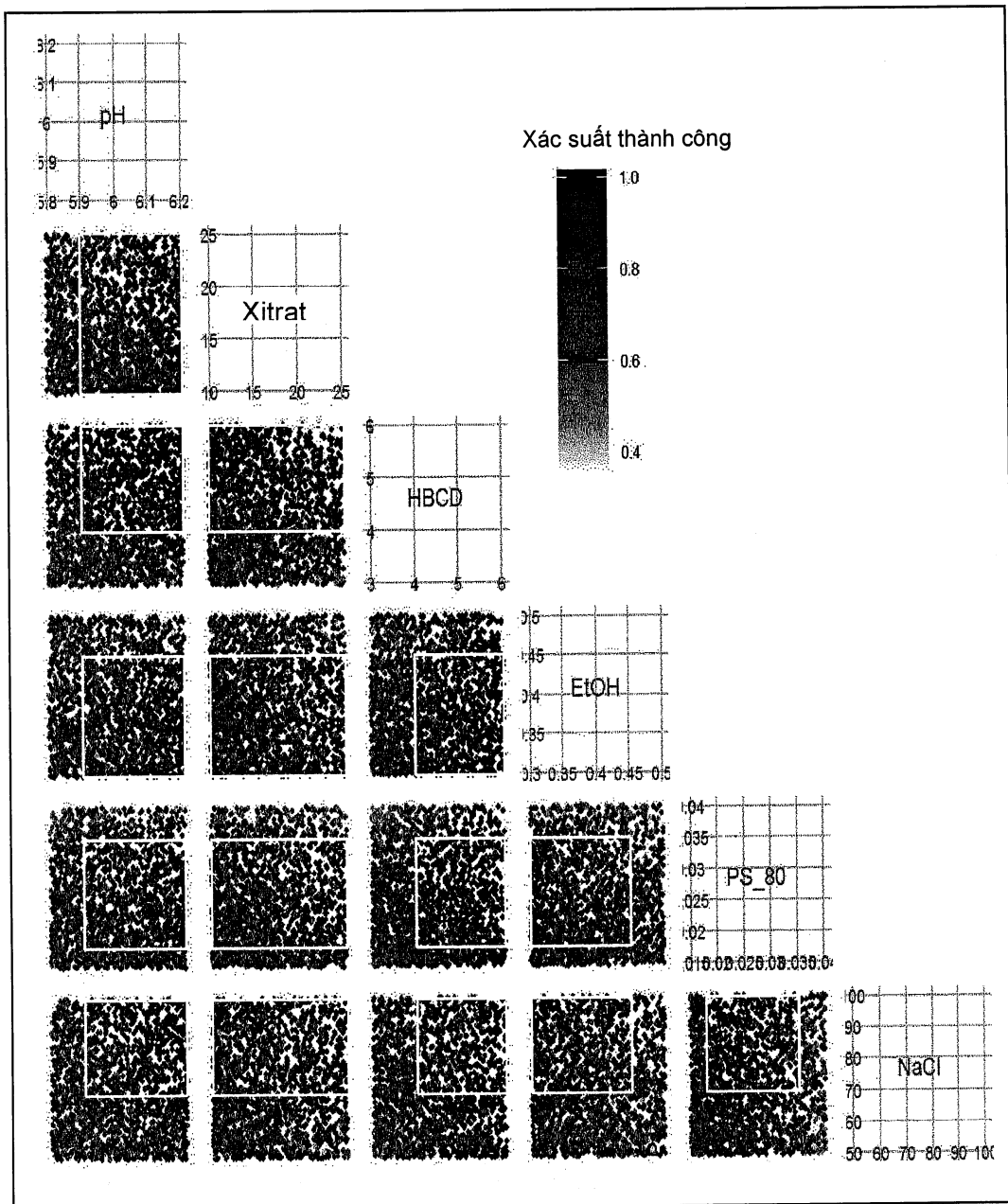
Hình 8



Hình 9



**Hình 10**



Hình 11