

COMPOSICIÓN FARMACÉUTICA DE VIRUS NO ENCAPSULADO

Campo de la invención

La presente invención se relaciona con el campo de los farmacéuticos, terapia y medicina genética, específicamente con las composiciones farmacéuticas de un vector con base de un virus no encapsulado recombinante, en particular, el virus adeno-asociado recombinante (rAAV), cuyas composiciones pueden utilizarse para el tratamiento y prevención de varias enfermedades.

Antecedentes de la invención

Los representantes típicos de los virus no encapsulados son los parvovirus, norovirus, así como los rotavirus y los adenovirus.

Los virus simples o no encapsulados consisten en un ácido nucleico y una envoltura de proteína denominada cápside. El ácido nucleico y la cápside interactúan entre sí para formar una nucleocápside. En cada virus, la oligomerización de proteínas de cápside durante la preparación de cápside generalmente conduce a un tipo en particular de estructura cuaternaria simétrica. La mayoría de los virus tienen cápsides de estructura espiral o icosaédrica (Lidmar J, Mirny L, Nelson Dr. Virus shapes and buckling transitions in spherical shells. *Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys.* 2003 Nov;68(5 Pt 1):051910. doi: 10.1103/PhysRevE.68.051910. Epub 2003 25 Nov. PMID: 14682823).

Al contrario de los virus no encapsulados, la cápside de los virus encapsulados está cubierta por una membrana de lípidos conocida como supercápside. La cápside adquiere la envoltura a partir de una membrana intracelular en el anfitrión del virus; entre los ejemplos se incluyen la membrana nuclear interna, la membrana del aparato de Golgi, y la membrana externa de la célula. La presencia de una envoltura de lípido hace que los virus sean menos resistentes a las presiones físicas y químicas (Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD (1994). *Molecular Biology of the Cell* (4° ed.). p. 280).

La cápside de virus no encapsulados lleva a cabo la función de proteger el genoma durante el almacenamiento a largo plazo, así como también de las presiones químicas y físicas, como la radiación UV, pH o temperaturas extremas, agentes proteolíticos y nucleolíticos. Los virus no encapsulados pueden conservar sus propiedades en estado seco por un periodo largo en varias superficies, ya sean porosas o no (Abad FX, Pinto RM, Bosch A. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Appl Environ Microbiol.* 1994 Oct;60(10):3704-10. doi: 10.1128/aem.60.10.3704-3710.1994. PMID: 7986043; PMCID: PMC201876).

Los virus introducen de manera estable su material genérico al genoma de una célula anfitriona, por lo que se propuso utilizarlo como vectores para entregar información genética a las células. Se emplean los vectores con base de retrovirus, adenovirus, virus adenoasociados (AAV), virus del herpes simple, etcétera. Entre estos virus, los adenovirus y AAV se refieren a virus no encapsulados.

Los vectores con base de AAV recombinante y adenovirus recombinante actualmente son los productos de terapia genética más utilizados y desarrollados, y se utilizan además en el desarrollo de vacunas.

Actualmente, la terapia genética se considera un enfoque potencialmente universal para el tratamiento de casi la totalidad del espectro de enfermedades: enfermedades infecciosas, enfermedades genéticas, neoplasmas malignos, etcétera.

Los virus o vectores virales (partículas virales) deben conservar su integridad estructural para ser infecciosos y biológicamente activos. La integridad estructural de un vector viral generalmente se destruye durante la preparación de vacunas o productos que contienen el vector viral, lo que excluye su uso como vector de entrega.

Los productos de vector viral se producen en forma congelada, lo que requiere una temperatura de almacenamiento por debajo de los -20 °C, a menudo por debajo de los -80 °C. Los liofilizados resuelven este problema, ya que poseen un régimen de temperatura de almacenamiento y transporte óptimo de 2 – 8 °C. Además, la liofilización se utiliza ampliamente para mejorar la estabilidad de varias vacunas y productos que contienen un vector de virus recombinante.

La técnica precedente provee composiciones farmacéuticas liofilizadas de AAV (WO2018/128689, WO2020/014479, WO2020/214929), composiciones farmacéuticas liofilizadas de adenovirus (WO00/29024, WO2017/013169, WO2018/103601).

No obstante, los liofilizados generalmente son relativamente caros, debido a que requieren mucho tiempo y costos elevados de materiales para su producción, y la actividad biológica de un vector viral puede perderse a cierto punto durante la liofilización y reconstitución del liofilizado. Además, el contenido de agua residual (humedad) en el producto final afecta de manera significativa la estabilidad del vector viral durante el almacenamiento.

De esta manera, existe una necesidad de obtener composiciones farmacéuticas estables que comprendan un vector de virus no encapsulado recombinante, inclusive composiciones farmacéuticas que permitan la obtención de una forma farmacéutica liofilizada estable sin la pérdida de actividad biológica del vector viral, así como también con tiempo mínimo de liofilización.

Descripción detallada de la invención

Los autores de la presente invención han descubierto de forma sorprendente que el agregado de hidroxipropil-beta-ciclodextrina aumenta la temperatura de transición de una composición farmacéutica que comprende un vector de virus no encapsulado recombinante durante la criodesecación, lo que permite reducir la duración del proceso de criodesecación, reducir el contenido de agua residual en el liofilizado, con lo que se obtiene la producción de una composición farmacéutica liofilizada que comprende un vector de virus no encapsulado recombinante, cuya composición presenta estabilidad durante el almacenamiento (por ejemplo, en el almacenamiento a largo plazo). Los autores de la presente invención también han descubierto de manera sorprendente que la formulación previa y el proceso de producción de liofilizado hacen posible la conservación de la actividad del vector de virus no encapsulado recombinante sin cambios durante un periodo largo. Además, los autores de la presente invención han descubierto de manera sorprendente que la solución de preliofilización (una composición farmacéutica acuosa) es estable y puede actuar como una forma farmacéutica finalizada.

Definiciones

A menos que se especifique lo contrario en el presente documento, todos los términos técnicos y científicos utilizados en relación con la presente invención tendrán el mismo significado que una persona versada en la técnica entiende generalmente.

Además, a menos que el contexto sugiera lo contrario, los términos singulares incluirán los términos plurales, y los términos plurales incluirán los términos singulares.

Tal como se utilizan en la presente descripción y las reivindicaciones que la siguen, a menos que se indique lo contrario según el contexto, las palabras “incluir” y “comprender”, o sus variaciones como “incluye”, “inclusive”, “comprende”, o “que comprende” se entenderán como que incluyen un número entero establecido o grupo de números enteros pero no excluye cualquier otro número entero o grupo de números enteros.

El término “composición farmacéutica” se refiere a una composición y/o formulación que comprende el vector de virus no encapsulado en una cantidad terapéuticamente efectiva y excipientes o sustancias auxiliares (excipientes, diluyentes, rellenos, disolventes, etcétera), cuya elección y proporciones dependerán del tipo y ruta de administración y dosificación.

El término “composición acuosa” como se utiliza en el presente documento se refiere a una composición con base de agua; el agua en la composición puede ser: agua, agua para inyecciones, solución fisiológica (0,9% - 1,0% solución acuosa de cloruro de sodio).

El término “criodisecado” como se utiliza en el presente documento se refiere a una formulación que se ha sometido a un proceso reconocido en la técnica como criodesecación, que incluye el congelamiento de la formulación seguido de la remoción de hielo de los contenidos congelados.

La composición farmacéutica es “estable” si el agente activo conserva su estabilidad física y/o estabilidad química y/o actividad biológica durante la vida útil especificada a temperatura de almacenamiento, por ejemplo, 2 – 8 °C. Además, el agente activo puede conservar la estabilidad física y química, así como la actividad biológica. El periodo de almacenamiento se ajusta en función a los resultados de la prueba de estabilidad en condiciones de maduración naturales o aceleradas.

El término “vector” como se utiliza en el presente documento se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha enlazado.

El término “almacenamiento a largo plazo” o “estabilidad a largo plazo” se deben entender como que una composición farmacéutica puede almacenarse durante tres o más meses, durante seis o más meses, durante un año o más, y la composición puede tener una vida útil estable mínima de al menos dos años también. En términos generales, los términos “almacenamiento a largo plazo” y “estabilidad a largo plazo” además incluyen duraciones de almacenamiento estable que son al menos comparables o mejores aún que la vida útil estable generalmente necesaria para las formulaciones comerciales disponibles actualmente, sin pérdidas en la estabilidad que volverían inapropiada la formulación para su aplicación farmacéutica prevista.

El término “agente amortiguador” se refiere a un componente de ácido o base (generalmente un ácido débil o una base débil) del amortiguador o solución amortiguadora. Un agente amortiguador ayuda a conservar el valor de pH de una solución determinada en un valor predeterminado o cerca de este, y los agentes amortiguadores generalmente se escogen para complementar el valor predeterminado. Un agente amortiguador puede ser un solo compuesto que da origen a un efecto amortiguador deseado, especialmente cuando este agente amortiguador se mezcla (y puede apropiadamente intercambiar protones con) una cantidad apropiada (en función del valor predeterminado deseado) de su correspondiente “conjugado ácido/base”.

El término “amortiguador” o “solución amortiguadora” se refiere a una solución acuosa que comprende una mezcla de un ácido (generalmente un ácido débil, como por ejemplo ácido acético, ácido cítrico) y una de sus bases conjugadas (como puede ser, por ejemplo, un acetato o sal de citrato, por ejemplo, acetato de sodio, citrato de sodio, así como también hidratos de estas sales, por ejemplo, trihidrato de acetato de sodio) o alternativamente una mezcla de una base (generalmente una base débil, por ejemplo, histidina) y uno de sus ácidos conjugados (por ejemplo, hidrocloreuro de histidina o hidrocloreuro monohidrato de histidina o hidrocloreuro (h/c) monohidrato (m/h) de L-histidina o h/c m/h de L-histidina o h/c m/h de histidina). El valor de pH de una “solución amortiguadora” cambia solamente de manera ligera luego de su agregado a una cantidad pequeña de una base fuerte o un ácido fuerte, así como también luego de la dilución o concentración debido al “efecto amortiguador” que brinda un “agente amortiguador”.

Generalmente, los aminoácidos son L-aminoácidos. Por ejemplo, si se utilizan histidina e hidrocloreuro monohidrato de histidina, generalmente será L-histidina e hidrocloreuro monohidrato de L-histidina. Por ejemplo, si se utiliza arginina, generalmente será L-arginina. También se pueden utilizar los equivalentes de aminoácidos, por ejemplo, sales de prolina farmacéuticamente aceptables (por ejemplo, hidrocloreuro de prolina).

Abreviaturas

PCR – reacción en cadena de polimerasa

EIA – inmunoensayo enzimático

FA – actividad funcional

Ct – cantidad de ciclos

TU – unidades de transducción

T_g – temperatura de transición vítrea

Vg – genomas virales

GFP – gen de proteína fluorescente verde

FAM – tinte carboxifluoresceína

BHQ-1 – extintor de fluorescencia utilizado en PCR

MOI – multiplicidad de infección

La presente invención divulga composiciones farmacéuticas estables del vector con base en un virus no encapsulado recombinante, en particular, el virus adenoasociado recombinante (rAAV), cuyas composiciones pueden utilizarse para el tratamiento y prevención de varias enfermedades.

Las formulaciones desarrolladas permiten producir un liofilizado del vector con base de virus no encapsulado recombinante, en particular rAAV, a pesar del alto contenido de cloruro de sodio en el virus que es necesario para la estabilización del virus no encapsulado. Se logra un contenido de agua bajo en el liofilizado, garantizando su estabilidad durante condiciones de almacenamiento a largo plazo y aceleradas. Además, las formulaciones desarrolladas permiten optimizar el proceso de criodesecación al reducir su duración.

En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica de un vector de virus no encapsulado recombinante; la composición comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,**
- (ii) un agente amortiguador,**
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina,**

- (iv) un surfactante,**
- (v) cloruro de sodio,**
- (vi) cloruro de magnesio,**
- (vii) agua para inyección.**

Se puede utilizar cualquier agente amortiguador farmacéuticamente aceptable como agente amortiguador. Los agentes amortiguadores son reconocidos en la técnica e incluyen, a mero título enunciativo, histidina, citrato de sodio, tri(hidroximetil)aminometano (TRIS), glicina, N-glicilglicina, acetato de sodio, carbonato de sodio, lisina, arginina, fosfato de sodio, fosfato de potasio, y mezclas entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el agente amortiguador es tri(hidroximetil)aminometano y ácido clorhídrico.

En algunas realizaciones de la invención, tri(hidroximetil)aminometano está presente en una concentración de 1,9 – 8,7 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el ácido clorhídrico se agrega a pH 6,0 – 8,0.

En algunas realizaciones de la invención, el agente amortiguador es L-histidina o L-arginina.

En algunas realizaciones de la invención, L-histidina está presente en una concentración de 0,4 – 10,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, L-arginina está presente en una concentración de 0,05 – 10,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, hidroxipropil-beta-ciclodextrina está presente en una concentración de 10,0 – 200,0 mg/ml.

Se puede utilizar cualquier surfactante farmacéuticamente aceptable como surfactante. Los surfactantes son reconocidos en la técnica e incluyen, a mero título enunciativo, polisorbato 20, polisorbato 80, varios poloxámeros y plurónicos, así como mezclas entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el surfactante está presente en una concentración de 0,01 – 2,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el surfactante es poloxámero 188.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro de sodio está presente en una concentración de 1,0 – 15,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro de magnesio está presente en una concentración de 0,05 – 1,0 mg/ml.

Se puede utilizar cloruro de magnesio en la forma de cloruro de magnesio anhidro y en la forma de sus hidratos. En algunas realizaciones de la invención, el cloruro de magnesio es hexahidrato de cloruro de magnesio.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica además comprende un disacárido.

Puede utilizarse cualquier disacárido farmacéuticamente aceptable como disacárido. Los disacáridos son reconocidos en la técnica e incluyen, a mero título enunciativo, trehalosa, sacarosa, así como también mezclas entre ellos.

En algunas realizaciones de la invención, el disacárido está presente en una concentración de 10,0 – 200,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el disacárido es trehalosa.

La trehalosa puede utilizarse en forma de trehalosa anhidra y en la forma de sus hidratos. En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa es dihidrato de trehalosa.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|-------|---|---------------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | tri(hidroximetil)aminometano | 1,9 – 8,7 mg/ml y |
| | ácido clorhídrico | a pH 6,0 – 8,0 |
| | O | |
| | L-histidina | 0,4 – 10,0 mg/ml y |
| | L-arginina | 0,05 – 10,0 mg/ml, |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 10,0 – 200,0 mg/ml, |
| (iv) | un surfactante | 0,01 – 2,0 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 1,0 – 15,0 mg/ml, |
| (vi) | cloruro de magnesio | 0,05 – 1,0 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml. |

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|-------|---|---------------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | tri(hidroximetil)aminometano | 1,9 – 8,7 mg/ml y |
| | ácido clorhídrico | a pH 6,0 – 8,0, |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 10,0 – 200,0 mg/ml, |
| (iv) | un surfactante | 0,01 – 2,0 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 1,0 – 15,0 mg/ml, |
| (vi) | cloruro de magnesio | 0,05 – 1,0 mg/ml, |

- (vii) agua para inyección a 1,0 ml.

En algunas realizaciones de la invención, tri(hidroximetil)aminometano está presente en una concentración de 2,22 – 7,76 mg/ml, o 2,22 – 7,46, o 2,42 – 7,26 mg/ml, o 1,9 – 3,0 mg/ml, o 2,22 – 2,66 mg/ml, o 2,42 mg/ml, o 5,7 – 8,7 mg/ml, o 6,76 – 7,76 mg/ml, o 7,06 – 7,46 mg/ml, o 7,26 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, se agrega ácido clorhídrico a pH 7,0 – 8,0, o a pH 7,3 – 7,8, o a pH 7,4 – 7,6, o a pH 7,5.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|-------|---|---------------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | L-histidina | 0,4 – 10,0 mg/ml y |
| | L-arginina | 0,05 – 10,0 mg/ml, |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 10,0 – 200,0 mg/ml, |
| (iv) | un surfactante | 0,01 – 2,0 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 1,0 – 15,0 mg/ml, |
| (vi) | cloruro de magnesio | 0,05 – 1,0 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml. |

En algunas realizaciones de la invención, L-histidina está presente en una concentración de 2,0 – 9,4 mg/ml, o 2,58 – 8,74 mg/ml, o 2,79 – 8,37 mg/ml, o 2,0 – 3,58 mg/ml, o 2,29 – 3,08 mg/ml, o 2,58 – 3,0 mg/ml, o 2,79 mg/ml, o 6,0 – 10,0 mg/ml, o 7,5 – 9,24 mg/ml, o 8,0 – 8,74 mg/ml, o 8,37 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, L-arginina está presente en una concentración de 0,248 – 1,344 mg/ml, o 0,3 – 1,2 mg/ml, o 0,348 – 1,044 mg/ml, o 0,248 – 0,448 mg/ml, o 0,3 – 0,396 mg/ml, o 0,348 mg/ml, o 0,744 – 1,344 mg/ml, o 0,888 – 1,2 mg/ml, o 1,044 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, hidroxipropil-beta-ciclodextrina está presente en una concentración de 30,0 – 110 mg/ml, o 40,0 – 105,0 mg/ml, o 50,0 – 100,0 mg/ml, 30,0 – 70,0 mg/ml, o 40,0 – 60,0 mg/ml, o 45,0-55,0 mg/ml, o 50,0 mg/ml, o 90,0 – 200,0 mg/ml, o 90,0 – 110,0 mg/ml, o 95,0 – 105,0 mg/ml, o 100,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el surfactante está presente en una concentración de 0,035 – 1,8 mg/ml, o 0,05 – 1,5 mg/ml, o 0,01 – 0,1 mg/ml, o 0,035 – 0,065 mg/ml, o 0,05 mg/ml, o 0,1 – 1,0 mg/ml, o 0,35 – 0,65 mg/ml, o 0,5 mg/ml, o 1,0 – 2,0 mg/ml, o 1,2 – 1,8 mg/ml, o 1,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el surfactante es poloxámero 188.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro de sodio está presente en una concentración de 2,5 – 14,14 mg/ml, o 3,88 – 13,64 mg/ml, o 3,0 – 13,14 mg/ml, o 4,38 – 6,5 mg/ml, o 4,5 – 6,0 mg/ml, o 1,0 – 7,0 mg/ml, o 1,0 – 6,0 mg/ml, o 2,5 – 3,5 mg/ml, o 3,0 mg/ml, o 3,88 – 4,88 mg/ml, o 4,38 mg/ml, o 4,5 mg/ml, o 5,5 – 6,5 mg/ml, o 6,0 mg/ml, o 9,0 – 15,0 mg/ml, o 12,14 – 14,14 mg/ml, o 12,64 – 13,64 mg/ml, o 13,14 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro de magnesio está presente en una concentración de 0,15 – 0,7 mg/ml, o 0,173 – 0,659 mg/ml, o 0,203 – 0,609 mg/ml, o 0,15 – 0,50 mg/ml, o 0,173 – 0,233 mg/ml, o 0,203 mg/ml, o 0,5 – 0,7 mg/ml, o 0,559 – 0,659 mg/ml, o 0,609 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro de magnesio es hexahidrato de cloruro de magnesio.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica previa además comprende un disacárido en una concentración de 10 – 200 mg/ml, o 20,0 – 150,0 mg/ml, o 25,0 – 100,0 mg/ml, o 25,0 – 50,0 mg/ml, o 20,0 – 30,0 mg/ml, o 23,0 – 27,0 mg/ml, o 25,0 mg/ml, o 30,0 – 70,0 mg/ml, o 30,0 – 36,6 mg/ml, o 32,3 – 34,3 mg/ml, o 33,3 mg/ml, o 4,0 – 55,0 mg/ml, o 50,0 mg/ml, o 90,0 – 200,0 mg/ml, o 100,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el disacárido es trehalosa.

En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa es dihidrato de trehalosa.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
O	
L-histidina	2,79 mg/ml y
L-arginina	0,348 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)

un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
-----------------------------------	------------
- (v) cloruro de sodio 6,0 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)

un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
-----------------------------------	------------
- (v) cloruro de sodio 6,0 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un virus de vector no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

L-histidina	2,79 mg/ml y
L-arginina	0,348 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)

un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
-----------------------------------	------------
- (v) cloruro de sodio 6,0 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
O	
L-histidina	2,79 mg/ml y
L-arginina	0,348 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)

un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
-----------------------------------	------------

- (v) cloruro de sodio 4,5 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii)

además comprende un disacárido que es trehalosa 25,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con
 - tri(hidroximetil)aminometano 2,42 mg/ml y
 - ácido clorhídrico a pH 6,0 – 8,0,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)
- un surfactante con poloxámero 188 0,5 mg/ml,
- (v) cloruro de sodio 4,5 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii)

además comprende un disacárido que es trehalosa 25,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con
 - L-histidina 2,79 mg/ml y
 - L-arginina 0,348 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)
- un surfactante con poloxámero 188 0,5 mg/ml,
- (v) cloruro de sodio 4,5 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii)

además comprende un disacárido que es trehalosa 25,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
O	
L-histidina	2,79 mg/ml y
L-arginina	0,348 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv) un surfactante con poloxámero 188 0,5 mg/ml,
- (v) cloruro de sodio 3,0 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii) además comprende un disacárido que es trehalosa 50,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv) un surfactante con poloxámero 188 0,5 mg/ml,
- (v) cloruro de sodio 3,0 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii) además comprende un disacárido que es trehalosa 50,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

L-histidina	2,79 mg/ml y
-------------	--------------

	L-arginina	0,348 mg/ml,
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	100,0 mg/ml,
(iv)		
	un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
(v)	cloruro de sodio	3,0 mg/ml,
(vi)	cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,
(vii)	agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)		

además comprende un disacárido que es trehalosa 50,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

(i)	un vector de virus no encapsulado recombinante,	
(ii)	un agente amortiguador con	
	tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
	ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
	O	
	L-histidina	2,79 mg/ml y
	L-arginina	0,348 mg/ml,
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	33,3 mg/ml,
(iv)		
	un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
(v)	cloruro de sodio	4,38 mg/ml,
(vi)	cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,
(vii)	agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)		

Además comprende un disacárido que es trehalosa 33,3 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

(i)	un vector de virus no encapsulado recombinante,	
(ii)	un agente amortiguador con	
	tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
	ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	33,3 mg/ml,
(iv)	un surfactante con poloxámero 188	

	0,5 mg/ml,
(v) cloruro de sodio	4,38 mg/ml,
(vi) cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,
(vii) agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)	

Además comprende un disacárido que es trehalosa 33.3 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

(i) un vector de virus no encapsulado recombinante,	
(ii) un agente amortiguador con	
L-histidina	2,79 mg/ml y
L-arginina	0,348 mg/ml,
(iii) hidroxipropil beta ciclodextrina	33,3 mg/ml,
(iv)	
un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
(v) cloruro de sodio	4,38 mg/ml,
(vi) cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,
(vii) agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)	

además comprende un disacárido que es trehalosa 33,3 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

(i) un vector de virus no encapsulado recombinante,	
(ii) un agente amortiguador con	
tri(hidroximetil)aminometano	7,26 mg/ml y
ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
O	
L-histidina	8,37 mg/ml y
L-arginina	1,044 mg/ml,
(iii) hidroxipropil beta ciclodextrina	100,0 mg/ml,
(iv)	
un surfactante con poloxámero 188	1,5 mg/ml,
(v) cloruro de sodio	13,14 mg/ml,
(vi) cloruro de magnesio	0,609 mg/ml,

- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii)

además comprende un disacárido que es trehalosa 100,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con
 - tri(hidroximetil)aminometano 7,26 mg/ml y
 - ácido clorhídrico a pH 6,0 – 8,0
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)
 - un surfactante con poloxámero 188 1,5 mg/ml,
- (v) cloruro de sodio 13,14 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,609 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii)

además comprende un disacárido que es trehalosa 100,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con
 - L-histidina 8,37 mg/ml y
 - L-arginina 1,044 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)
 - un surfactante con poloxámero 188 1,5 mg/ml,
- (v) cloruro de sodio 13,14 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,609 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii)

además comprende un disacárido que es trehalosa 100,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa es dihidrato de trehalosa.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro de magnesio es hexahidrato de cloruro de magnesio.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
O	
L-histidina	2,79 mg/ml y
L-arginina	0,348 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)

un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
-----------------------------------	------------
- (v) cloruro de sodio 6,0 mg/ml,
- (vi) hexahidrato de cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)

un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
-----------------------------------	------------
- (v) cloruro de sodio 6,0 mg/ml,
- (vi) hexahidrato de cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

L-histidina	2,79 mg/ml y
L-arginina	0,348 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,

- | | | |
|-------|------------------------------------|--------------|
| (iv) | un surfactante con poloxámero 188 | 0,5 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 6,0 mg/ml, |
| (vi) | hexahidrato de cloruro de magnesio | 0,203 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml. |

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|--------|--|----------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | tri(hidroximetil)aminometano | 2,42 mg/ml y |
| | ácido clorhídrico | a pH 6,0 – 8,0 |
| | O | |
| | L-histidina | 2,79 mg/ml y |
| | L-arginina | 0,348 mg/ml, |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 100,0 mg/ml, |
| (iv) | un surfactante con poloxámero 188 | 0,5 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 4,5 mg/ml, |
| (vi) | hexahidrato de cloruro de magnesio | 0,203 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml y |
| (viii) | además comprende un disacárido que es dihidrato de trehalosa | 25,0 mg/ml. |

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|-------|---|-----------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | tri(hidroximetil)aminometano | 2,42 mg/ml y |
| | ácido clorhídrico | a pH 6,0 – 8,0, |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 100,0 mg/ml, |
| (iv) | un surfactante con poloxámero 188 | 0,5 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 4,5 mg/ml, |
| (vi) | hexahidrato de cloruro de magnesio | 0,203 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml y |

- (viii) además comprende un disacárido que es dihidrato de trehalosa

25,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con
 - L-histidina 2,79 mg/ml y
 - L-arginina 0,348 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)
 - un surfactante con poloxámero 188 0,5 mg/ml,
- (v) cloruro de sodio 4,5 mg/ml,
- (vi) hexahidrato de cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii) además comprende un disacárido que es dihidrato de trehalosa 25,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con
 - tri(hidroximetil)aminometano 2,42 mg/ml y
 - ácido clorhídrico a pH 6,0 – 8,0
 - O
 - L-histidina 2,79 mg/ml y
 - L-arginina 0,348 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)
 - un surfactante con poloxámero 188 0,5 mg/ml,
- (v) cloruro de sodio 3,0 mg/ml,
- (vi) hexahidrato de cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii) además comprende un disacárido que es dihidrato de trehalosa 50,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)

un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
-----------------------------------	------------
- (v) cloruro de sodio 3,0 mg/ml,
- (vi) hexahidrato de cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii) además comprende un disacárido que es dihidrato de trehalosa 50,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

L-histidina	2,79 mg/ml y
L-arginina	0,348 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv)

un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
-----------------------------------	------------
- (v) cloruro de sodio 3,0 mg/ml,
- (vi) hexahidrato de cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii) además comprende un disacárido que es dihidrato de trehalosa 50,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
O	
L-histidina	2,79 mg/ml y

	L-arginina	0,348 mg/ml,
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	33,3 mg/ml,
(iv)		
	un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
(v)	cloruro de sodio	4,38 mg/ml,
(vi)	hexahidrato de cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,
(vii)	agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)	además comprende un disacárido que es dihidrato de trehalosa	33,3 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

(i)	un vector de virus no encapsulado recombinante,	
(ii)	un agente amortiguador con	
	tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
	ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	33,3 mg/ml,
(iv)		
	un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
(v)	cloruro de sodio	4,38 mg/ml,
(vi)	hexahidrato de cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,
(vii)	agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)	además comprende un disacárido que es dihidrato de trehalosa	33,3 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

(i)	un vector de virus no encapsulado recombinante,	
(ii)	un agente amortiguador con	
	L-histidina	2,79 mg/ml y
	L-arginina	0,348 mg/ml,
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	33,3 mg/ml,
(iv)		
	un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
(v)	cloruro de sodio	4,38 mg/ml,
(vi)	hexahidrato de cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,

- | | | |
|--------|--|-------------|
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml y |
| (viii) | además comprende un disacárido que es dihidrato de trehalosa | 33,3 mg/ml. |

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|--------|--|----------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | tri(hidroximetil)aminometano | 7,26 mg/ml y |
| | ácido clorhídrico | a pH 6,0 – 8,0 |
| | O | |
| | L-histidina | 8,37 mg/ml y |
| | L-arginina | 1,044 mg/ml, |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 100,0 mg/ml, |
| (iv) | | |
| | un surfactante con poloxámero 188 | 1,5 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 13,14 mg/ml, |
| (vi) | hexahidrato de cloruro de magnesio | 0,609 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml y |
| (viii) | además comprende un disacárido que es dihidrato de trehalosa | 100,0 mg/ml. |

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|--------|--|----------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | tri(hidroximetil)aminometano | 7,26 mg/ml y |
| | ácido clorhídrico | a pH 6,0 – 8,0 |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 100,0 mg/ml, |
| (iv) | | |
| | un surfactante con poloxámero 188 | 1,5 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 13,14 mg/ml, |
| (vi) | hexahidrato de cloruro de magnesio | 0,609 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml y |
| (viii) | además comprende un disacárido que es dihidrato de trehalosa | 100,0 mg/ml. |

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|--------|---|--------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | L-histidina | 8,37 mg/ml y |
| | L-arginina | 1,044 mg/ml, |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 100,0 mg/ml, |
| (iv) | | |
| | un surfactante con poloxámero 188 | 1,5 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 13,14 mg/ml, |
| (vi) | hexahidrato de cloruro de magnesio | 0,609 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml y |
| (viii) | además comprende un disacárido que es dihidrato | |
| | de trehalosa | 100,0 mg/ml. |

En algunas realizaciones de la invención, se agrega ácido clorhídrico a pH 7,0 – 8,0, o a 7,3 – 7,8, o a pH 7,4 – 7,6, o a pH 7,5.

En algunas realizaciones de la invención, las composiciones farmacéuticas previamente mencionadas son apropiadas para la liofilización, es decir, pueden actuar como una solución de pre- liofilización.

En un aspecto, la presente invención se relaciona con una composición farmacéutica de un vector de virus no encapsulado recombinante, cuya composición se provee en forma seca (es decir, polvo o granulado) a disolver en un disolvente apropiado (por ejemplo, agua) antes de la administración. Esta composición farmacéutica puede prepararse, por ejemplo, mediante liofilización, es decir, un proceso que es reconocido en la técnica como criodesecación, que involucra el congelamiento de un producto seguido de la remoción de disolvente de los contenidos congelados.

En un aspecto, la presente invención se relaciona con una **composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante; esta composición está producida por la liofilización de cualquier composición farmacéutica previamente descrita.** Por lo tanto, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden ser composiciones farmacéuticas acuosas o composiciones farmacéuticas liofilizadas (liofilizados).

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante es producida por la liofilización de una composición farmacéutica que comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

tri(hidroximetil)aminometano	1,9 – 8,7 mg/ml y
ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
O	
L-histidina	0,4 – 10,0 mg/ml y
L-arginina	0,05 – 10,0 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 10,0 – 200,0 mg/ml,
- (iv) un surfactante 0,01 – 2,0 mg/ml,
- (v) cloruro de sodio 1,0 – 15,0 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,05 – 1,0 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante es producida por la liofilización de una composición farmacéutica que comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
O	
L-histidina	2,79 mg/ml y
L-arginina	0,348 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 100,0 mg/ml,
- (iv) un surfactante con poloxámero 188 0,5 mg/ml,
- (v) cloruro de sodio 6,0 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante es producida por la liofilización de una composición farmacéutica que comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con

tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0

O		
	L-histidina	2,79 mg/ml y
	L-arginina	0,348 mg/ml,
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	100,0 mg/ml,
(iv)		
	un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
(v)	cloruro de sodio	4,5 mg/ml,
(vi)	cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,
(vii)	agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)		
	además comprende un disacárido que es trehalosa	25,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante es producida por la liofilización de una composición farmacéutica que comprende los siguientes elementos:

(i)	un vector de virus no encapsulado recombinante,	
(ii)	un agente amortiguador con	
	tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
	ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
O		
	L-histidina	2,79 mg/ml y
	L-arginina	0,348 mg/ml,
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	100,0 mg/ml,
(iv)		
	un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
(v)	cloruro de sodio	3,0 mg/ml,
(vi)	cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,
(vii)	agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)		
	además comprende un disacárido que es trehalosa	50,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante es producida por la liofilización de una composición farmacéutica que comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante
- (ii) un agente amortiguador con

	tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
	ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
	O	
	L-histidina	2,79 mg/ml y
	L-arginina	0,348 mg/ml,
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	33,3 mg/ml,
(iv)		
	un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
(v)	cloruro de sodio	4,38 mg/ml,
(vi)	cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,
(vii)	agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)		
	además comprende un disacárido que es trehalosa	33,3 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante es producida por la liofilización de una composición farmacéutica que comprende los siguientes elementos:

(i)	un vector de virus no encapsulado recombinante,	
(ii)	un agente amortiguador con	
	tri(hidroximetil)aminometano	7.26 mg/ml y
	ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
	O	
	L-histidina	8,37 mg/ml y
	L-arginina	1,044 mg/ml,
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	100,0 mg/ml,
(iv)		
	un surfactante con poloxámero 188	1,5 mg/ml,
(v)	cloruro de sodio	13,14 mg/ml,
(vi)	cloruro de magnesio	0,609 mg/ml,
(vii)	agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)		
	además comprende un disacárido que es trehalosa	100,0 mg/ml.

Los liofilizados se utilizan para producir otras formas farmacéuticas. Por ejemplo, un liofilizado para preparar una solución inyectable, un liofilizado para preparar una solución de infusión, un liofilizado para preparar un concentrado para preparar una solución de infusión. Los liofilizados se constituyen al disolverlos en un disolvente apropiado, generalmente en agua para

inyección. Además, las composiciones liofilizadas se reconstituyen primero en el volumen requerido de disolvente (generalmente en agua) y luego se diluyen en un disolvente apropiado (por ejemplo, 5% solución de glucosa, 0,9% solución de cloruro de sodio).

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante está diseñada para preparar una solución inyectable.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante está diseñada para preparar una solución para la administración intramuscular, intravenosa, o subcutánea.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante está presente en un vial.

En algunas realizaciones de la invención, el vial es un vial de vidrio o de plástico.

En un aspecto, la presente invención se relaciona con **una composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante; la composición posteriormente se reconstituye en un disolvente acuoso y comprende los siguientes elementos:**

- (i) **un vector de virus no encapsulado recombinante,**
- (ii) **un agente amortiguador**
- (iii) **hidroxipropil beta ciclodextrina,**
- (iv) **un surfactante,**
- (v) **cloruro de sodio,**
- (vi) **cloruro de magnesio,**
- (vii) **agua para inyección.**

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con
 - tri(hidroximetil)aminometano 1,9 – 3,0 mg/ml y
 - ácido clorhídrico a pH 6,0 – 8,0
 - O
 - L-histidina 0,4 – 10,0 mg/ml y
 - L-arginina 0,05 – 10,0 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 20,0 – 100,0 mg/ml,

- | | | |
|-------|---------------------|-------------------|
| (iv) | un surfactante | 0,01 – 1,0 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 1,0 – 6,0 mg/ml, |
| (vi) | cloruro de magnesio | 0,05 – 1,0 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml. |

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|-------|---|---------------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | tri(hidroximetil)aminometano | 1,9 – 3,0 mg/ml y |
| | ácido clorhídrico | a pH 6,0 – 8,0 |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 20,0 – 100,0 mg/ml, |
| (iv) | un surfactante | 0,01 – 1,0 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 1,0 – 6,0 mg/ml, |
| (vi) | cloruro de magnesio | 0,05 – 1,0 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml. |

En algunas realizaciones de la invención, tri(hidroximetil)aminometano está presente en una concentración de 2,22 – 2,66 mg/ml, o 2,42 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, se agrega ácido clorhídrico a pH 7,0 – 8,0, o a pH 7,3 – 7,8, o a pH 7,4 – 7,6, pH 7,5.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|-------|---|---------------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | L-histidina | 0,4 – 10,0 mg/ml y |
| | L-arginina | 0,05 – 10,0 mg/ml, |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 20,0 – 100,0 mg/ml, |
| (iv) | un surfactante | 0,01 – 1,0 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 1,0 – 6,0 mg/ml, |
| (vi) | cloruro de magnesio | 0,05 – 1,0 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml. |

En algunas realizaciones de la invención, L-histidina está presente en una concentración de 2,0 – 3,58 mg/ml, o 2,29 – 3,08 mg/ml, o 2,58 – 3,0 mg/ml, o 2,79 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, L-arginina está presente en una concentración de 0,248 – 0,448 mg/ml, o 0,3 – 0,396 mg/ml, o 0,348 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, hidroxipropil-beta-ciclodextrina está presente en una concentración de 30,0 – 70,0 mg/ml, o 30,0 – 36,6 mg/ml, o 33,3 mg/ml, o 40,0 – 60,0 mg/ml, o 45,0 – 55,0 mg/ml, o 50,0 mg/ml, o 90,0 – 100,0 mg/ml, 100,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el surfactante está presente en una concentración de 0,01 – 0,1 mg/ml, o 0,035 – 0,065 mg/ml, o 0,05 mg/ml, o 0,1 – 1,0 mg/ml, o 0,35 – 0,065 mg/ml, o 0,5 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el surfactante es poloxámero 188.

En algunas realizaciones de la invención, el cloruro de sodio está presente en una concentración de 1,0 – 7,0 mg/ml, o 1,0 – 6,0 mg/ml, o 2,5 – 3,5 mg/ml, o 3,0 mg/ml, o 3,88 – 4,88 mg/ml, o 4,38 mg/ml, o 4,5 mg/ml, o 5,5 – 6,5 mg/ml, o 6,0 mg/ml.

En algunas realizaciones, el cloruro de magnesio está presente en una concentración de 0,15 – 0,50 mg/ml, o 0,173 – 0,233 mg/ml, o 0,203 mg/ml.

En algunas realizaciones, el cloruro de magnesio es hexahidrato de cloruro de magnesio.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica previamente mencionada además comprende un disacárido en una concentración de 20,0 – 100,0 mg/ml, 20,0 – 30,0 mg/ml, o 23,0 – 27,0 mg/ml, o 25,0 mg/ml, o 30,0 – 70,0 mg/ml, o 30,0 – 36,6 mg/ml, o 32,3 – 34,3 mg/ml, o 33,3 mg/ml, o 45,0 – 55,0 mg/ml, o 50,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, el disacárido es trehalosa.

En algunas realizaciones de la invención, la trehalosa es dihidrato de trehalosa.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|-------|---|----------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | tri(hidroximetil)aminometano | 2,42 mg/ml y |
| | ácido clorhídrico | a pH 6,0 – 8,0 |
| | O | |
| | L-histidina | 2,79 mg/ml y |
| | L-arginina | 0,348 mg/ml, |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 100,0 mg/ml, |
| (iv) | | |
| | un surfactante con poloxámero 188 | 0,5 mg/ml, |

- | | | |
|-------|---------------------|--------------|
| (v) | cloruro de sodio | 6,0 mg/ml, |
| (vi) | cloruro de magnesio | 0,203 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml. |

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|-------|---|-----------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | tri(hidroximetil)aminometano | 2,42 mg/ml y |
| | ácido clorhídrico | a pH 6,0 – 8,0, |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 100,0 mg/ml, |
| (iv) | | |
| | un surfactante con poloxámero 188 | 0,5 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 6,0 mg/ml, |
| (vi) | cloruro de magnesio | 0,203 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml. |

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|-------|---|--------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | L-histidina | 2,79 mg/ml y |
| | L-arginina | 0,348 mg/ml, |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 100,0 mg/ml, |
| (iv) | | |
| | un surfactante con poloxámero 188 | 0,5 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 6,0 mg/ml, |
| (vi) | cloruro de magnesio | 0,203 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml. |

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

- | | |
|------|---|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, |
| (ii) | un agente amortiguador con |

	tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
	ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
	O	
	L-histidina	2,79 mg/ml y
	L-arginina	0,348 mg/ml,
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	100,0 mg/ml,
(iv)		
	un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
(v)	cloruro de sodio	4,5 mg/ml,
(vi)	cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,
(vii)	agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)		
	además comprende un disacárido que es trehalosa	25,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

(i)	un vector de virus no encapsulado recombinante,	
(ii)	un agente amortiguador con	
	tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
	ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0,
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	100,0 mg/ml,
(iv)		
	un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
(v)	cloruro de sodio	4,5 mg/ml,
(vi)	cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,
(vii)	agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)		
	además comprende un disacárido que es trehalosa	25.0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

(i)	un vector de virus no encapsulado recombinante,	
(ii)	un agente amortiguador con	
	L-histidina	2,79 mg/ml y

	L-arginina	0,348 mg/ml,
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	100,0 mg/ml,
(iv)		
	un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
(v)	cloruro de sodio	4,5 mg/ml,
(vi)	cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,
(vii)	agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)		

además comprende un disacárido que es trehalosa 25,0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

(i)	un vector de virus no encapsulado recombinante,	
(ii)	un agente amortiguador con	
	tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
	ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0
	O	
	L-histidina	2,79 mg/ml y
	L-arginina	0,348 mg/ml,
(iii)	hidroxipropil beta ciclodextrina	100,0 mg/ml,
(iv)		
	un surfactante con poloxámero 188	0,5 mg/ml,
(v)	cloruro de sodio	3,0 mg/ml,
(vi)	cloruro de magnesio	0,203 mg/ml,
(vii)	agua para inyección	a 1,0 ml y
(viii)		

además comprende un disacárido que es trehalosa 50.0 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

(i)	un vector de virus no encapsulado recombinante,	
(ii)	un agente amortiguador con	
	tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml y
	ácido clorhídrico	a pH 6,0 – 8,0,

- | | | |
|--------|---|--------------|
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 100,0 mg/ml, |
| (iv) | | |
| | un surfactante con poloxámero 188 | 0,5 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 3,0 mg/ml, |
| (vi) | cloruro de magnesio | 0,203 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml y |
| (viii) | | |
| | además comprende un disacárido que es trehalosa | 50,0 mg/ml. |

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|--------|---|--------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | L-histidina | 2,79 mg/ml y |
| | L-arginina | 0,348 mg/ml, |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 100,0 mg/ml, |
| (iv) | | |
| | un surfactante con poloxámero 188 | 0,5 mg/ml, |
| (v) | cloruro de sodio | 3,0 mg/ml, |
| (vi) | cloruro de magnesio | 0,203 mg/ml, |
| (vii) | agua para inyección | a 1,0 ml y |
| (viii) | | |
| | además comprende un disacárido que es trehalosa | 50.0 mg/ml. |

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

- | | | |
|-------|---|----------------|
| (i) | un vector de virus no encapsulado recombinante, | |
| (ii) | un agente amortiguador con | |
| | tri(hidroximetil)aminometano | 2,42 mg/ml y |
| | ácido clorhídrico | a pH 6,0 – 8,0 |
| | O | |
| | L-histidina | 2,79 mg/ml y |
| | L-arginina | 0,348 mg/ml, |
| (iii) | hidroxipropil beta ciclodextrina | 33,3 mg/ml, |

- (iv) un surfactante con poloxámero 188 0,5 mg/ml,
- (v) cloruro de sodio 4,38 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii) además comprende un disacárido que es trehalosa 33,3 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con
 - tri(hidroximetil)aminometano 2,42 mg/ml y
 - ácido clorhídrico a pH 6,0 – 8,0
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 33,3 mg/ml,
- (iv) un surfactante con poloxámero 188 0,5 mg/ml,
- (v) cloruro de sodio 4,38 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,
- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
- (viii) además comprende un disacárido que es trehalosa 33,3 mg/ml.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica liofilizada de un vector de virus no encapsulado recombinante, luego de ser reconstituida en un disolvente acuoso, comprende los siguientes elementos:

- (i) un vector de virus no encapsulado recombinante,
- (ii) un agente amortiguador con
 - L-histidina 2,79 mg/ml y
 - L-arginina 0,348 mg/ml,
- (iii) hidroxipropil beta ciclodextrina 33,3 mg/ml,
- (iv) un surfactante con poloxámero 188 0,5 mg/ml,
- (v) cloruro de sodio 4,38 mg/ml,
- (vi) cloruro de magnesio 0,203 mg/ml,

- (vii) agua para inyección a 1,0 ml y
(viii)

además comprende un disacárido que es trehalosa 33.3 mg/ml.

Las composiciones farmacéuticas descriptas son apropiadas para entregar agentes terapéuticos a sujetos para el tratamiento o la prevención de varias enfermedades o patologías. Pueden utilizarse en terapia génica para el tratamiento de enfermedades como hemofilia A, hemofilia B, neoplasmas malignos, atrofia muscular espinal, etcétera, así como también en el desarrollo de vacunas para la prevención de, por ejemplo, enfermedades infecciosas.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención pueden comprender el vector de virus no encapsulado recombinante en varias concentraciones. La concentración del vector viral dependerá, por ejemplo, de la enfermedad a prevenir o tratar con el uso de las composiciones farmacéuticas previas, así como también la edad, peso y estado de salud del paciente, y por lo tanto variarán de paciente a paciente. Una dosis apropiada se puede ajustar con la decisión del médico de asistencia de forma tal que se administre al paciente una vez o con varias inyecciones.

En algunas realizaciones de la invención, el vector de virus no encapsulado recombinante está presente en una concentración de $1,0 \times 10^5 - 1,0 \times 10^{14}$ genomas virales/ml, o $1,0 \times 10^9 - 1,0 \times 10^{14}$ genomas virales/ml, o $1,0 \times 10^9 - 5,0 \times 10^{13}$ genomas virales/ml, o $1,0 \times 10^9 - 1,0 \times 10^{13}$ genomas virales/ml, o $(1,0 \pm 0,5) \times 10^5$ genomas virales/ml, o $(1,0 \pm 0,5) \times 10^6$ genomas virales/ml, o $(1,0 \pm 0,5) \times 10^7$ genomas virales/ml, o $(1,0 \pm 0,5) \times 10^8$ genomas virales/ml, o $(1,0 \pm 0,5) \times 10^9$ genomas virales/ml, o $(1,0 \pm 0,5) \times 10^{10}$ genomas virales/ml, o $(1,0 \pm 0,5) \times 10^{11}$ genomas virales/ml, o $(1,0 \pm 0,5) \times 10^{12}$ genomas virales/ml, o $(1,0 \pm 0,5) \times 10^{13}$ genomas virales/ml, o $(1,0 \pm 0,5) \times 10^{14}$ genomas virales/ml.

Los virus no encapsulados recombinantes en las composiciones farmacéuticas previas pueden ser rAAV, adenovirus recombinantes y otros tipos de virus no encapsulados recombinantes.

El vector de adenovirus recombinante puede producirse con el uso de cualquier especie, cepa, serotipo o cualquier combinación de especies, cepas, o serotipos de adenovirus o adenovirus quimérico. Los serotipos de adenovirus humano incluyen cualquiera de los serotipos 2, 4, 5, 7, 11, 26, 34, 35, 36, 48, 49 o 50 o sus combinaciones, derivados, modificaciones, o pseudotipos.

En algunas realizaciones de la invención, el vector de virus no encapsulado recombinante es un vector rAAV. Puede producirse con el uso de cualquier cepa, serotipo AAV (por ejemplo, AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 y AAV16) o cualquier combinación de cepas, serotipos (por ejemplo, un vector rAAV que incluye dos o más serotipos); puede contener una proteína cápside de AAV

(cápside) de cualquier serotipo (AAV1, AAV2, AAV3, AAV4, AAV5, AAV6, AAV7, AAV8, AAV9, AAV10, AAV11, AAV12, AAV13, AAV14, AAV15 y AAV16) o sus combinaciones, derivados, modificaciones, o pseudotipos.

En algunas realizaciones de la invención, el vector rAAV comprende cápside de AAV5 o AAV9.

En algunas realizaciones de la invención, la cápside de AAV5 o AAV9 puede ser una cápside modificada.

El vector rAAV puede modificarse genética y/o químicamente.

El vector rAAV puede modificarse genéticamente para producir vectores rAAV con uso de receptor alterado, antigenicidad, eficiencia de transducción y/o tropismo de tejido, para insertar ligandos de péptido, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, MHC (complejo mayor de histocompatibilidad) y/o receptores en la cápside viral. Por ejemplo, el vector rAAV puede modificarse genéticamente al introducir una o más mutaciones de aminoácido, como las mutaciones puntuales.

La frase “más mutaciones puntuales” se refiere a tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, o diez sustituciones puntuales.

Las realizaciones preferidas particularmente incluyen sustituciones (mutaciones) que son conservadoras por naturaleza, es decir, sustituciones que tienen lugar dentro de una familia de aminoácidos que se juntan en sus cadenas laterales. En particular, los aminoácidos generalmente se dividen en cuatro familias: (1) aminoácidos acídicos que son aspartato y glutamato; (2) aminoácidos básicos que son lisina, arginina, histidina; (3) aminoácidos no polares que son alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano, y (4) aminoácidos polares sin carga que son glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina, treonina, tirosina. A veces fenilalanina, triptófano, y tirosina se clasifican como aminoácidos aromáticos. Por ejemplo, se puede predecir con cierta razonabilidad que una sustitución aislada de leucina por isoleucina o valina, un aspartato por un glutamato, una treonina por una serina, o una sustitución conservadora similar de aminoácido por un aminoácido estructuralmente relacionado, no tendrá un mayor efecto en la actividad biológica. Por ejemplo, el polipéptido que interesa en este caso incluye hasta alrededor de 5 a 10 sustituciones conservadoras o no conservadoras de aminoácidos, siempre y cuando la función deseada de la molécula permanezca intacta.

Una variante de mutaciones puntuales en las secuencias de proteínas AAV VP1, VP2, o VP3 que utilizan sustituciones es una sustitución de al menos un residuo de aminoácido en la proteína AAV VP1, VP2, o VP3 con otro residuo de aminoácido.

Las sustituciones conservadoras se muestran en la Tabla A en la columna “sustituciones preferidas”.

Tabla A		
Residuo inicial	Sustituciones de ejemplo	Sustituciones preferidas
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg(R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn(N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln(Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly(G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe(F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser(S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp(W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr(Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleucina	Leu

Por ejemplo, la solicitud internacional WO2012/145601 describe viriones de virus adeno-asociado (AAV) con proteína cápside variante, donde los viriones AAV presentan una mayor infectividad de células retinales, cuando se administra mediante inyección intravítrea, en comparación con AAV de tipo natural. La solicitud internacional WO2013/158879 describe un vector de virus adeno-asociado (AAV) para entrar a un sujeto una secuencia de ácido nucleico heteróloga que comprende la proteína cápside VP1 que comprende una o más sustituciones de lisina, donde una sustitución de lisina es K137R, en donde esta sustitución de lisina es efectiva para inhibir la ubiquitinación de dicha proteína cápside, con lo que aumenta la eficiencia de transducción del vector AAV en las células objetivo.

El vector de rAAV puede modificarse químicamente para alterar el tropismo de tejido. Además, los vectores con base de rAAV modificados químicamente pueden presentar uso de receptor alterado, antigenicidad, eficiencia de transducción, y/o tropismo de tejido. Los vectores de rAAV modificados químicamente se crean al utilizar, por ejemplo, reacciones quimiosselectivas que pueden atacar cadenas laterales específicas de aminoácidos, pueden utilizarse para cambiar la carga, polaridad, hidrofobicidad y potencial de uniones de hidrógeno dentro de los dominios de unión de receptor en cápsides AAV.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica de un vector de virus no encapsulado recombinante de acuerdo con la presente invención está diseñada para la administración parenteral.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica de un vector de virus no encapsulado recombinante de acuerdo con la presente invención está diseñada para la administración intramuscular, intravenosa, o subcutánea.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica de un vector de virus no encapsulado recombinante de acuerdo con la presente invención está diseñada para la administración de forma intravenosa como una infusión.

En algunas realizaciones de la invención, la composición farmacéutica de un vector de virus no encapsulado recombinante de acuerdo con la presente invención puede usarse luego de la dilución. En este sentido, el volumen necesario de la composición es transferido de un vial a un recipiente de infusión que comprende una solución de cloruro de sodio estéril 0,9% o una solución de dextrosa estéril 5%. La solución resultante se mezcla al dar vuelta gentilmente el recipiente de la infusión.

En algunas realizaciones de la invención, el sujeto del tratamiento, o paciente, es un mamífero, preferentemente un sujeto humano. Este sujeto puede ser macho o hembra, de cualquier edad.

Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención pueden almacenarse en cualquier recipiente apropiado. Por ejemplo, un recipiente de vidrio o plástico, vial, ampolla, jeringa, cartucho, o botella del volumen deseado. Los recipientes pueden proveerse con medios adicionales para la administración, como pueden ser goteros, o autoinyectores.

Una composición farmacéutica de acuerdo con la invención puede fabricarse, empaquetarse, o comercializarse ampliamente en la forma de una sola unidad de dosificación o varias unidades de dosificación en la forma de una formulación lista. El término “una sola unidad de dosificación” como se utiliza en el presente documento se refiere a una cantidad específica de una composición farmacéutica que contiene una cantidad predeterminada de un ingrediente activo. La cantidad del ingrediente activo generalmente es igual a la dosis del ingrediente activo a

administrar en un sujeto, o una parte conveniente de esa dosis, por ejemplo, una mitad o un tercio de esta dosis.

Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse como un solo agente terapéutico o en combinación con agentes terapéuticos adicionales como se requiera. De esta manera, en una realización, los presentes métodos para el tratamiento y/o profilaxis se utilizan en combinación con la administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de otro agente activo. El otro agente activo puede administrarse antes, durante, o luego de la administración de las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención. El otro agente activo puede administrarse como parte de la presente composición o, alternativamente, como una formulación independiente.

Ejemplos

Los siguientes ejemplos se proveen para un mejor entendimiento de la invención. Estos ejemplos sirven solo de modo ilustrativo y no se deberán interpretar como limitantes del alcance de la invención de ninguna manera.

Todas las publicaciones, patentes, y solicitudes de patente mencionadas en la presente especificación se incorporan al presente documento por referencia. A pesar de que se ha descrito en detalle la invención previa a modo de ilustración y ejemplo para obtener claridad en el entendimiento, las personas versadas en la técnica verán obvio que a la luz de las enseñanzas de la presente invención ciertos cambios y modificaciones pueden realizarse a ella sin alejarse del espíritu o alcance de las realizaciones adjuntas.

Métodos

1. Determinación de transiciones térmicas mediante calorimetría diferencial de barrido.

Se determinaron las transiciones térmicas mediante la calorimetría diferencial de barrida en el calorímetro diferencial de barrido DSC4000, Perkin Elmer, Estados Unidos, en crisoles cerrados de acero con anillos de goma. El ensayo utilizó 50 µl de la muestra. Una solución excipiente o una solución de proceso se utilizó como la solución de prueba. Las transiciones de temperatura se estudiaron en el rango de (25)°C a (-85)°C en incrementos en el rango de 0,5 – 10 °C/min. Las temperaturas de transición de fase se determinaron con el uso del software Pyris Series DSC 4000.

2. Determinación de contenido de agua.

Se midió el contenido de agua según el procedimiento K. Fischer de acuerdo con RF SP GM.1.2.3.0002.15.

3. Determinación de genomas virales (gen GFP) en el producto de AAV mediante PCR.

La concentración del gen GFP en el producto de AAV se determinó mediante la reacción de cadena de polimerasa cuantitativa con el uso de un cebador inverso, directo, y una sonda conjugada con el tinte FAM y colorante inhibidor BHQ1. Los cebadores se emparejaron a una región del gen que codifica la proteína GFP. Durante la preparación de la muestra, se trató la muestra con ADNasa para deshacerse del plásmido residual de ADN, luego con proteinasa para destruir la cápside. Se utilizó un plásmido linealizado (pAAV_GFP CellBioLab) para trazar una línea de calibración. Para trazar una línea de calibración de concentración logarítmica como una función de cantidad de ciclos (Ct), se utilizaron estándares con un incremento de 10. La concentración de genomas virales/ml (vg/ml) o copias/ml en el producto se determinó mediante la línea de calibración de concentración logarítmica como una función de Ct.

4. Determinación de concentración de partículas virales mediante inmunoensayo enzimático.

Se midió la concentración de partículas de vector viral (cápsides de virus adeno-asociado (AAV)) mediante un inmunoensayo enzimático con el uso de kits comerciales: análisis volumétrico PROGEN AAV5 ELISA y análisis volumétrico PROGEN AAV9.

Se recubrieron placas de 96 pozos de alta fijación con anticuerpos de ratón monoclonales de unión de cápside anti-AAV que reconocen el epítipo conformacional de un serotipo particular. Las proteínas de cápside de AAV se unen a los anticuerpos bajo incubación de temperatura; los componentes no unidos de la muestra se removieron mediante el lavado de la placa varias veces.

Los anticuerpos biotinilados que se unen a las proteínas de cápside de AAV bajo incubación de temperatura de la placa se utilizaron como anticuerpos de detección. Los componentes sin unir se removieron mediante el lavado de la placa varias veces.

Se aplicó conjugado de peroxidasa estreptavidina-rábano picante para detectar el color. La estreptavidina unida a biotina y los componentes no unidos se removieron mediante el lavado de la placa varias veces.

La tetrametilbenzidina actúa como un cromógeno. La interacción de peroxidasa de rábano picante, peróxido de hidrógeno y cromógeno de tetrametilbenzidina desarrolla una reacción de color. La reacción EIA se detuvo con el agregado de una solución de detención (1 normal H_2SO_4), y la densidad óptica de las soluciones en los pozos se midió en una longitud de onda de 450 nm. La concentración de partículas de vector viral en el producto se determinó mediante un gráfico de calibración trazado con el uso de datos de densidad óptica de soluciones estándar con concentración conocida de partículas AAV.

5. Determinación de la actividad funcional del producto en función del vector viral adeno-asociado que comprende el gen GFP.

Se midió la actividad de transducción del producto en función del vector viral adeno-asociado recombinante que comprende el gen GFP mediante la expresión GFP en células CHO-K1 inducidas por el producto.

Para la transducción, el día del análisis, las células CHO-K1 se depositaron en placas de 24 pozos en un medio de crecimiento con un antibiótico (MQD – medio para determinación cuantitativa) a una tasa de 1×10^4 células por cm^2 (19.000 células por pozo) y se incubaron a una temperatura de $+37^\circ\text{C}$ en una atmósfera con 5% CO_2 durante 4-8 h para la adhesión de las células a la superficie plástica. Las muestras del ensayo a 3 dosis, 3 replicantes por cada una, se introdujeron posteriormente en los pozos con células. Las dosificaciones del producto (MOI) para cada serotipo de AAV se preseleccionaron para obtener, luego de la transducción, alrededor de 5, 10 y 20% de células GFP positivas, respectivamente. El volumen de producto necesario para la transducción de un pozo se calculó con el uso de la siguiente fórmula:

$$V = \frac{MOI \times S \times K}{C},$$

donde V es el volumen de producto necesario por pozo (ml), S es el área de un pozo (cm^2), MOI es la dosis necesaria del producto, *multiplicidad de infección* (vg/cl), K es la densidad de siembra de células en los pozos (células/ cm^2), C es la concentración de cápsides que contienen genoma en el producto (vg/ml).

Las placas con células transducidas se incubaron en un incubador de CO_2 (5% CO_2 , $+37^\circ\text{C}$) durante 2-3 días. Luego del periodo de incubación, se recolectó flujo de cultivo de los pozos, los pozos se lavaron con solución de Hanks, y las células se removieron del plástico con el uso de solución TrypLE (a 150 μl /pozo). Luego de extraer las células del plástico, la solución de Hanks (1:1 con TrypLE) se introdujo en los pozos, las células se recolectaron en microtubos de 1,5 ml y se centrifugaron por 5 min a 300g. El precipitado celular se volvió a suspender en 150 μl de solución de Hanks. 50 ml de una solución de tinta de operación para la determinación de células viables en la solución de Hanks se agregó a cada muestra, excepto por 1 pozo de control de isotipo, las células se incubaron por 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Las células teñidas se centrifugaron por 5 minutos a 300g, el sobrenadante se seleccionó cuidadosamente y 100 μl de amortiguador de fijación BD Cytotfix se agregó a cada muestra. Las células se volvieron a suspender, y el volumen entero de la suspensión celular resultante se transfirió a una placa con fondo en forma de V de 96 pozos para el citómetro de flujo; la placa con las células se incubó durante 20 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente. Luego del periodo de incubación, la

placa se centrifugó durante 5 minutos a 1200 rpm, se recolectó un amortiguador de fijación, y las células se lavaron con Amortiguador de Tinte (PBS con 0,1% azida de sodio y 0,5% BSA) a 100 µl/pozo. La placa se centrifugó nuevamente y el amortiguador se recolectó, y luego se introdujo el Amortiguador de Tinte a 150 µl/célula y las células se volvieron a suspender cuidadosamente.

Las células se analizaron en un citómetro de flujo. Se evaluó la viabilidad celular y la expresión GFP. El valor de FA (actividad funcional) o TU (unidad de transducción)/ml se calculó para cada dosis de producto de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$TU = \frac{P \times N}{V} \times D,$$

en donde P es la cantidad de células viables GFP positivas como porcentaje, N es la cantidad de células inicialmente depositadas ($N=S \times K$), V es el volumen introducido del producto por pozo (ml), D es el factor de dilución previa del producto.

Se consideró el resultado final el valor medio de TU para 3 dosis de producto.

6. Preparación de las formulaciones.

Las muestras con el contenido objetivo de genomas virales se prepararon en células de concentración de Stirred Cell (Millipore) bajo presión. En este sentido, la formulación de solución inicial que contiene partículas virales se ubicó en un recipiente de diafiltración, luego al menos un volumen por 10 de una solución acuosa con la formulación objetivo que incluye amortiguación, agentes osmóticos, y, de ser necesario, estabilizantes solubles en agua adicionales, se introdujeron en la célula. Luego del proceso de diafiltración, la solución se concentró a una densidad óptica que excede la densidad objetivo, se extrajo del instrumento, la densidad óptica exacta se determinó mediante espectrofotometría UV y la concentración de genomas virales se determinó mediante PCR. Una solución apropiada de excipientes se agregó posteriormente a la muestra para preparar una solución con un contenido de genoma viral objetivo.

Además, las muestras de las soluciones que contienen partículas virales se obtuvieron en casetes Pellicon (Millipore) en modo de flujo tangencial. En este sentido, la formulación de solución inicial se ubicó en un tanque de diafiltración, luego un volumen de al menos 10 veces la solución con la formulación objetivo que comprende amortiguación, agentes osmóticos, y, de ser necesario, estabilizantes solubles en agua adicionales, se suministraron al sistema. El concentrado de agentes osmóticos y estabilizantes solubles en agua puede agregarse alternativamente luego de la diafiltración. Luego del proceso de diafiltración, la solución se concentró a una densidad óptica que excede la densidad objetivo, se extrajo del sistema, y los valores exactos de densidad óptica y concentración de genomas virales se determinó. Posteriormente se agregó una solución apropiada de excipientes a la muestra para preparar una solución con contenido de genoma viral objetivo.

Al preparar las formulaciones que comprenden solubilizantes, se agregaron concentrados de surfactante a la solución luego de la diafiltración y concentrado con la dilución final al contenido de genoma viral objetivo con una solución de excipientes.

Antes del relleno aséptico en el recipiente final (por ejemplo, un recipiente de vidrio/plástico, vial o jeringa), la solución se filtró con el uso de una membrana de 0,22 µm.

Ejemplo 1. Liofilización de formulaciones.

Se llevó a cabo la criodesecación de las formulaciones de acuerdo con el siguiente esquema: Congelamiento – duración hasta 300 minutos, temperatura hasta -70°C. Secado inicial – duración hasta 4000 min, temperatura de -40°C a 40°C. Vacío de 0 mbar a 0,25 mbar. Segundo secado – duración hasta 4000 min, temperatura de 0°C a 40°C. Vacío de 0 a 0,25 mbar. Cada etapa incluyó una o más etapas adicionales.

Ejemplo 2. Selección de formulaciones para optimizar el modo de criodesecación.

La optimización apuntó a la reducción de la duración del proceso de criodesecación, así como también a la reducción de contenido de agua residual en el liofilizado. En este sentido, se recomienda aprobar una cantidad de formulaciones, seguido de la medición de la temperatura de transición del vidrio.

Se sabe que el agregado de cloruro de sodio a la formulación ayuda a reducir la temperatura de transición del vidrio de la formulación (Electrolyte-induced changes in glass transition temperature of freeze-concentrated solutes, Pharmaceutical Research, vol.12, n°5, 1995). No obstante, este componente es un estabilizante efectivo para partículas virales, evita su agregado y no puede excluirse de la formulación (Pharmaceutical Development of AAV-Based Gene Therapy Products for the Eye. Gerard A. Rodrigues & Evgenyi Shalaev & Thomas K. Karami & James Cunningham & Nigel K. H. Slater & Hongwen M. Rivers, Pharm Res (2019) 36: 29).

El proceso de criodesecación alcanza su mayor efectividad cuando se configura y conserva la temperatura de un estante secador en frío en límites superiores del sistema y estabilidad del producto. De esta manera, la temperatura debería configurarse a un nivel que esté algunos grados debajo de la temperatura de colapso. El término colapso se refiere a un proceso en el que las estructuras creadas durante la criodesecación se destruyen cuando pasan el límite de separación de fase de sublimación, lo que puede llevar no solamente a la alteración de propiedades funcionales del liofilizado, sino también a una menor eficiencia de la criodesecación debido a los caminos de evaporación bloqueados, lo que a su vez da como resultado una humedad retenida y distribuida de manera desapareja.

La sustancia resultante en la solución de excipiente final es una mezcla amorfa. La temperatura de transición del vidrio es la temperatura en la que una sustancia no cristizable o

una sustancia que no tiene tiempo para cristalizarse se vuelve sólida, pasando de esta manera a un estado vídrio. La temperatura de colapso de las soluciones generalmente es de 1-3 °C más que la temperatura de transición del vidrio. De esta manera, a mayor temperatura de transición del vidrio, mayor podrá ser la temperatura para los estantes, lo que resulta en un proceso de criodesecación acelerado.

Se seleccionaron los siguientes excipientes para la prueba. tri(hidroximetil)aminometano (agente amortiguador, conservación del nivel de pH necesario), cloruro de sodio (estabilizante, osmolítico), hexahidrato de cloruro de magnesio (estabilizante), dihidrato de trehalosa (estabilizante, osmolítico, lioprotector), poloxámero p188 (solubilizante), polivinilpirrolidona K-30 (estabilizante), polivinilpirrolidona K-90 (estabilizante), sal de sodio sulfobutil-éter-beta-ciclodextrina (estabilizante, lioprotector), hidroxipropil-beta-ciclodextrina (estabilizante, lioprotector), L-histidina (agente amortiguador, conservación del nivel de pH necesario, estabilizante), L-arginina (agente amortiguador, conservación del nivel de pH necesario, estabilizante).

Los resultados de la determinación de las temperaturas de transición del vidrio para las soluciones excipientes de prueba se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2 – Temperaturas de transición del vidrio para diferentes formulaciones.

N°	Composición farmacéutica	T'g, °C
1	Tri(hidroximetil)aminometano - 7,26 mg/ml Cloruro de sodio - 13,14 mg/ml Hexahidrato de cloruro de magnesio - 1,22 mg/ml Dihidrato de trehalosa - 150 mg/ml Poloxámero p188 - 1,5 mg/ml Ácido clorhídrico - a pH 7,5	-35,55
2	Tri(hidroximetil)aminometano - 7,26 mg/ml Cloruro de sodio - 13,14 mg/ml Hexahidrato de cloruro de magnesio - 1,22 mg/ml Dihidrato de trehalosa - 50 mg/ml Sal de sodio sulfobutil-éter-beta-ciclodextrina - 100 mg/ml Poloxámero p188 - 1,5 mg/ml Ácido clorhídrico - a pH 7,5	-37,83
3	Tri(hidroximetil)aminometano - 7,26 mg/ml Cloruro de sodio - 13,14 mg/ml Hexahidrato de cloruro de magnesio - 1,22 mg/ml Sal de sodio sulfobutil-éter-beta-ciclodextrina - 150 mg/ml Poloxámero p188 - 1,5 mg/ml Ácido clorhídrico - a pH 7,5	-41,37
4	Tri(hidroximetil)aminometano - 7,26 mg/ml Cloruro de sodio - 13,14 mg/ml Hexahidrato de cloruro de magnesio - 1,22 mg/ml Polivinilpirrolidona K-30 - 150 mg/ml	-28,65

N°	Composición farmacéutica	T _g , °C
	Poloxámero p188 - 1,5 mg/ml Ácido clorhídrico - a pH 7,5	
5	Tri(hidroximetil)aminometano - 7,26 mg/ml Cloruro de sodio - 13,14 mg/ml Hexahidrato de cloruro de magnesio - 1,22 mg/ml Polivinilpirrolidona K-90 - 60 mg/ml Poloxámero p188 - 1,5 mg/ml Ácido clorhídrico - a pH 7,5	-38,69
6	Tri(hidroximetil)aminometano - 7,26 mg/ml Cloruro de sodio - 13,14 mg/ml Hexahidrato de cloruro de magnesio - 1,22 mg/ml Dihidrato de trehalosa - 50 mg/ml Hidroxipropil-beta-ciclodextrina - 100 mg/ml Poloxámero p188 - 1,5 mg/ml Ácido clorhídrico - a pH 7,5	-26,37
7	Tri(hidroximetil)aminometano - 7,26 mg/ml Cloruro de sodio - 13,14 mg/ml Hexahidrato de cloruro de magnesio - 1,22 mg/ml Polivinilpirrolidona K-90 - 60 mg/ml Dihidrato de trehalosa - 90 mg/ml Poloxámero p188 - 1,5 mg/ml Ácido clorhídrico - a pH 7,5	-31,10
8	Tri(hidroximetil)aminometano - 7,26 mg/ml Cloruro de sodio - 13,14 mg/ml Hexahidrato de cloruro de magnesio - 1,22 mg/ml Hidroxipropil-beta-ciclodextrina - 150 mg/ml Poloxámero p188 - 1,5 mg/ml Ácido clorhídrico - a pH 7,5	-20,52
9	Tri(hidroximetil)aminometano - 7,26 mg/ml Cloruro de sodio - 13,14 mg/ml Hexahidrato de cloruro de magnesio - 1,22 mg/ml Dihidrato de trehalosa - 50 mg/ml Poloxámero p188 - 1,5 mg/ml Ácido clorhídrico - a pH 7,5	-37,15

De acuerdo con los resultados, se descubrió que hidroxipropil-beta-ciclodextrina aumenta significativamente la temperatura de transición del vidrio de una mezcla que comprende cloruro de sodio.

El desarrollo apuntó además a la determinación de la relación óptima de los contenidos de dihidrato de trehalosa, hidroxipropil beta-ciclodextrina y cloruro de sodio, así como también la evaluación de la aplicabilidad de soluciones amortiguadoras de L-histidina y L-arginina para producir una forma liofílica. El estudio se llevó a cabo para las muestras que contienen aproximadamente 1×10^{-11} vg/ml de AAV5 recombinante que comprende el gen GFP en un experimento de diseño de mezcla de 3 factores completo con dos niveles y el punto central repetido

3 veces. La concentración de dihidrato de trehalosa (de 0,0 a 100,0 mg/ml), cloruro de sodio (de 3,0 a 12,0 mg/ml) y la concentración de hidroxipropil-beta-ciclodextrina (de 0,0 a 100,0 mg/ml) se estudiaron como factores cuantitativos. Poloxámero 188 (en el rango de 0,05 – 2,0 mg/ml) y hexahidrato de cloruro de magnesio (en el rango de 0,15 – 0,70 mg/ml) no tienen un efecto estadísticamente significativo en la temperatura de transición del vidrio.

Los resultados del experimento se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3 – Resultados del experimento para formulaciones con base de AAV5 en una concentración de 1×10^{11} vg/ml

No,	Concentración de excipiente en formulación				T'g, °C
	Dihidrato de trehalosa, mg/ml	Cloruro de sodio, mg/ml	Hidroxipropil-beta-ciclodextrina, mg/ml	Solución amortiguadora, ml ¹	
10	0	3,0	0	a 1,0	-34,58
11	100,0	3,0	0	a 1,0	-35,07
12	0	12,0	0	a 1,0	-40,78
13	100,0	12,0	0	a 1,0	-43,29
14	0	3,0	100,0	a 1,0	-16,77
15	100,0	3,0	100,0	a 1,0	-25,48
16	0	12,0	100,0	a 1,0	-27,98
17	100,0	12,0	100,0	a 1,0	-29,92
18	50,0	7,5	50,0	a 1,0	-31,72
19	50,0	7,5	50,0	a 1,0	-30,88
20	50,0	7,5	50,0	a 1,0	-31,04
¹ Formulación de la solución amortiguadora: L-histidina - 2,79 mg/ml; L-arginina - 0,348 mg/ml; hexahidrato de cloruro de magnesio - 0,203 mg/ml; poloxámero p188 – 0,5 mg/ml.					

Los datos resultantes se procesaron en el software MODDE.

De acuerdo con los resultados, la formulación N° 14 (L-histidina – 2,79 mg/ml; L-arginina – 0,348 mg/ml; hexahidrato de cloruro de magnesio – 0,203 mg/ml; poloxámero p188 – 0,5 mg/ml; cloruro de sodio – 3,0 mg/ml; hidroxipropil-beta-ciclodextrina – 100,0 mg/ml) presentó la máxima temperatura de transición de vidrio.

Además, el efecto del proceso de criodesecación en las partículas virales AAV5 y AAV9 recombinantes que comprenden el gen GFP se evaluó, el rango de trabajo para la concentración de partículas virales se estableció, así como también se llevó a cabo una evaluación comparativa de la aplicabilidad de soluciones amortiguadoras de L-arginina, L-histidina, y

tri(hidroximetil)aminometano para producir una forma liofílica. Los datos se muestran para las composiciones mencionadas en la Tabla 4.

Tabla 4 – Lista de formulaciones para criodesecación

Componente	Formulació n 21	Formulació n 22	Formulació n 23	Formulació n 24	Formulació n 25	Formulació n 26
AAV5 o AAV9	1×10^{11} vg/ml	1×10^{11} vg/ml	1×10^{11} vg/ml	1×10^{11} vg/ml	1×10^{11} vg/ml	1×10^{11} vg/ml
L-histidina	2,79 mg/ml	2,79 mg/ml	2,79 mg/ml	-	-	-
L-arginina	0,348 mg/ml	0,348 mg/ml	0,348 mg/ml	-	-	-
Cloruro de sodio	6,0 mg/ml	4,5 mg/ml	3,0 mg/ml	6,0 mg/ml	4,5 mg/ml	3,0 mg/ml
Hexahidrato de cloruro de magnesio	0,203 mg/ml	0,203 mg/ml	0,203 mg/ml	0,203 mg/ml	0,203 mg/ml	0,203 mg/ml
Dihidrato de trehalosa	-	25 mg/ml	50 mg/ml	-	25 mg/ml	50 mg/ml
Hidroxipropil beta ciclodextrina	100 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml	100 mg/ml
Poloxámero p188	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml	0,5 mg/ml
Tri(hidroximetil) aminometano	-	-	-	2,42 mg/ml	2,42 mg/ml	2,42 mg/ml
Ácido clorhídrico	-	-	-	a pH 7,5	a pH 7,5	a pH 7,5

Los resultados del control de calidad de liofilizados de AAV5 y AAV9 se muestran en las Tablas 5 y 6.

Tabla 5 –Resultados de control de calidad de liofilizados de AAV5

Nº	T'g, °C	Radio hidrodinámico, nm	Concentrac ión (PCR), vg/ml	Concentrac ión (EIA), partículas/ ml	Actividad, FA/ml	Agua, %	Tiempo de reconstitución, seg.
21	-21,51	10,1	$2,1 \times 10^{11}$	$2,6 \times 10^{11}$	$5,6 \times 10^6$	1,03	Menor a 10
22	-20,88	9,7	$2,5 \times 10^{11}$	$3,1 \times 10^{11}$	$6,2 \times 10^6$	0,98	Menor a 10
23	-21,13	10,5	$2,4 \times 10^{11}$	$2,8 \times 10^{11}$	$5,3 \times 10^6$	1,01	Menor a 10
24	-21,32	11,3	$1,8 \times 10^{11}$	$2,0 \times 10^{11}$	$3,6 \times 10^6$	0,84	Menor a 10
25	-20,03	9,8	$3,0 \times 10^{11}$	$3,6 \times 10^{11}$	$7,0 \times 10^6$	0,92	Menor a 10
26	-20,84	10,0	$3,1 \times 10^{11}$	$3,4 \times 10^{11}$	$6,8 \times 10^6$	1,10	Menor a 10

Tabla 6 –Resultados de control de calidad de liofilizados de AAV9

Nº	T'g, °C	Radio hidrodinámico, nm	Concentración (PCR), vg/ml	Concentración (EIA), partículas/ml	Actividad, FA/ml	Agua, %	Tiempo de reconstitución, seg.
21	-21,92	17,3	$2,6 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^{11}$	$3,5 \times 10^6$	1,39	Menor a 10
22	-20,76	16,9	$3,4 \times 10^{11}$	$3,9 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^6$	1,21	Menor a 10
23	-21,64	16,7	$2,9 \times 10^{11}$	$3,2 \times 10^{11}$	$5,1 \times 10^6$	1,13	Menor a 10
24	-21,12	15,6	$2,5 \times 10^{11}$	$2,9 \times 10^{11}$	$3,9 \times 10^6$	1,09	Menor a 10
25	-20,25	17,1	$2,9 \times 10^{11}$	$3,3 \times 10^{11}$	$5,0 \times 10^6$	1,12	Menor a 10
26	-20,66	17,3	$2,7 \times 10^{11}$	$3,2 \times 10^{11}$	$4,3 \times 10^6$	1,09	Menor a 10

Se ha demostrado que todas las formulaciones de prueba son apropiadas para producir una forma farmacéutica liofilizada. El contenido de agua en todas las muestras no excede 1,4%, el tiempo de reconstitución del liofilizado no excede los 10 segundos, y el tiempo de criodesecación es solamente de 48 horas. Luego de la reconstitución, no se observó reducción en el título y la actividad funcional de las muestras.

Las formulaciones se produjeron posteriormente con diferentes contenidos de genomas virales. Los resultados del control de calidad de los liofilizados de AAV5 y AAV9 con diferentes contenidos de genoma viral se incluyen en la Tabla 7. Los datos se incluyen para la formulación N° 25.

Tabla 7 – Resultados de control de calidad de liofilizados de AAV5 y AAV9 con diferentes contenidos de genoma viral

Nº	T'g, °C	Concentración (PCR), vg/ml	Concentración (EIA), partículas/ml	Actividad, FA/ml	Agua, %	Tiempo de reconstitución, seg.
AAV5						
25-1	-24,03	$1,9 \times 10^9$	$2,2 \times 10^9$	$3,6 \times 10^4$	1,53	Menor a 10
25-2	-20,11	$2,6 \times 10^{12}$	$3,0 \times 10^{12}$	$5,2 \times 10^7$	1,00	Menor a 10
25-3	-19,50	$9,0 \times 10^{13}$	$9,4 \times 10^{13}$	$7,3 \times 10^8$	0,89	Menor a 10
AAV9						
25-4	-24,25	$3,2 \times 10^9$	$3,6 \times 10^9$	$2,9 \times 10^4$	1,33	Menor a 10
25-5	-20,59	$2,7 \times 10^{12}$	$3,1 \times 10^{12}$	$5,5 \times 10^7$	0,98	Menor a 10
25-6	-18,37	$8,7 \times 10^{13}$	$9,2 \times 10^{13}$	$7,0 \times 10^9$	0,87	Menor a 10

Para evaluar aún más la posibilidad de liofilización de soluciones concentradas por 3, se prepararon composiciones de preliofilización para AAV5 y AAV9, como se muestra en las Tablas 8 y 9. Los resultados de control de las muestras resultantes luego de la reconstitución de liofilizados se muestran en la Tabla 10.

Tabla 8 – Formulaciones de AAV5 (N° 27) y AAV9 (N° 28) concentradas en función de tri(hidroximetil)aminometano

Componente	Solución de preiofilización	Solución de preiofilización concentrada por 3	Solución reconstituida
AAV5 o AAV9	1×10^{11} vg/ml	3×10^{11} vg/ml	1×10^{11} vg/ml
Cloruro de sodio	4,38 mg/ml	13,14 mg/ml	4,38 mg/ml
Hexahidrato de cloruro de magnesio	0,203 mg/ml	0,609 mg/ml	0,203 mg/ml
Dihidrato de trehalosa	33,3 mg/ml	100,0 mg/ml	33,3 mg/ml
Hidroxipropil beta ciclodextrina	33,3 mg/ml	100,0 mg/ml	33,3 mg/ml
Poloxámero p188	0,5 mg/ml	1,5 mg/ml	0,5 mg/ml
Tri(hidroximetil)aminometano	2,42 mg/ml	7,26 mg/ml	2,42 mg/ml
Ácido clorhídrico	a pH 7,5	a pH 7,5	a pH 7,5

Tabla 9 – Formulaciones de AAV5 (N° 29) y AAV9 (N° 30) concentradas en función de L-histidina y L-arginina

Componente	Solución de preiofilización	Solución de preiofilización concentrada por 3	Solución reconstituida
AAV5 o AAV9	1×10^{11} vg/ml	3×10^{11} vg/ml	1×10^{11} vg/ml
Cloruro de sodio	4,38 mg/ml	13,14 mg/ml	4,38 mg/ml
Hexahidrato de cloruro de magnesio	0,203 mg/ml	0,609 mg/ml	0,203 mg/ml
Dihidrato de trehalosa	33,3 mg/ml	100,0 mg/ml	33,3 mg/ml
Hidroxipropil beta ciclodextrina	33,3 mg/ml	100,0 mg/ml	33,3 mg/ml
Poloxámero p188	0,5 mg/ml	1,5 mg/ml	0,5 mg/ml
L-histidina	2,79 mg/ml	8,37 mg/ml	2,79 mg/ml
L-arginina	0,348 mg/ml	1,044 mg/ml	0,348 mg/ml

Tabla 10 – Resultados de control de liofilizados reconstituidos obtenidos de soluciones de AAV5 y AAV9 con preiofilización concentradas (reconstituidas en volumen disolvente por 3)

N°	Concentración (PCR), vg/ml	Concentración (EIA), partículas/ml	Actividad, FA/ml	Agua, %	Tiempo de reconstitución, seg.
AAV5					
27	$1,8 \times 10^{11}$	$2,0 \times 10^{11}$	$3,5 \times 10^6$	1,02	Menor a 10
29	$2,2 \times 10^{11}$	$2,5 \times 10^{11}$	$2,9 \times 10^6$	1,24	Menor a 10
AAV9					
28	$2,3 \times 10^{11}$	$2,7 \times 10^{11}$	$3,2 \times 10^6$	1,10	Menor a 10
30	$1,6 \times 10^{11}$	$1,8 \times 10^{11}$	$3,1 \times 10^6$	1,16	Menor a 10

Además, las formulaciones se produjeron para concentración de genomas virales (copias) de alrededor de 1×10^{11} por ml (expresado en términos de formulación de preliofilización) y se transfirieron a la investigación de estabilidad.

Los resultados del estudio de estabilidad para la formulación N° 25 se muestran en las Tablas 11 y 12.

Tabla 11 – Resultados de estudio de estabilidad de liofilizado de AAV5 (formulación N° 25)

Punto de maduración	Radio hidrodinámico, nm	Concentración (PCR), vg/ml	Concentración (EIA), partículas/ml	Actividad, FA/ml	Agua, %	Tiempo de reconstitución, seg.
Estudio de estabilidad a largo plazo (maduración a una temperatura de 2-8 °C)						
1 mon	11,3	$2,6 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^{11}$	$6,1 \times 10^6$	0,96	Menor a 10
2 mon	11,0	$2,3 \times 10^{11}$	$2,8 \times 10^{11}$	$5,5 \times 10^6$	1,27	Menor a 10
3 mon	12,2	$2,7 \times 10^{11}$	$3,2 \times 10^{11}$	$4,9 \times 10^6$	1,11	Menor a 10
6 mon	11,8	$2,2 \times 10^{11}$	$2,6 \times 10^{11}$	$6,3 \times 10^6$	1,08	Menor a 10
Estudio de estabilidad acelerado (maduración a temperatura (25 ± 2) °C y humedad relativa $(60 \pm 5)\%$)						
1 mon	11,1	$2,2 \times 10^{11}$	$2,7 \times 10^{11}$	$5,8 \times 10^6$	1,00	Menor a 10
2 mon	11,8	$2,7 \times 10^{11}$	$3,2 \times 10^{11}$	$4,9 \times 10^6$	1,16	Menor a 10
3 mon	11,3	$1,8 \times 10^{11}$	$2,1 \times 10^{11}$	$4,5 \times 10^6$	1,33	Menor a 10
6 mon	12,0	$2,3 \times 10^{11}$	$2,7 \times 10^{11}$	$5,3 \times 10^6$	1,10	Menor a 10

Tabla 12 – Resultados de estudio de estabilidad de liofilizado de AAV9 (formulación N° 25)

Punto de maduración	Radio hidrodinámico, nm	Concentración (PCR), vg/ml	Concentración (EIA), partículas /ml	Actividad, FA/ml	Agua, %	Tiempo de reconstitución, seg.
Estudio de estabilidad a largo plazo (maduración a una temperatura de 2-8 °C)						
1 mon	17,0	$3,6 \times 10^{11}$	$3,9 \times 10^{11}$	$4,5 \times 10^6$	1,12	Menor a 10
2 mon	17,2	$2,7 \times 10^{11}$	$3,2 \times 10^{11}$	$4,0 \times 10^6$	1,45	Menor a 10
3 mon	16,6	$2,4 \times 10^{11}$	$3,0 \times 10^{11}$	$4,7 \times 10^6$	1,50	Menor a 10
6 mon	17,9	$3,1 \times 10^{11}$	$3,6 \times 10^{11}$	$3,8 \times 10^6$	1,13	Menor a 10
Estudio de estabilidad acelerado (maduración a temperatura (25 ± 2) °C y humedad relativa $(60 \pm 5)\%$)						
1 mon	17,3	$2,8 \times 10^{11}$	$3,1 \times 10^{11}$	$4,3 \times 10^6$	1,30	Menor a 10
2 mon	16,7	$2,1 \times 10^{11}$	$2,6 \times 10^{11}$	$5,0 \times 10^6$	1,15	Menor a 10
3 mon	16,9	$1,7 \times 10^{11}$	$2,0 \times 10^{11}$	$4,8 \times 10^6$	1,33	Menor a 10
6 mon	16,2	$1,8 \times 10^{11}$	$2,2 \times 10^{11}$	$4,0 \times 10^6$	1,25	Menor a 10

De esta manera, hemos desarrollado formulaciones de liofilizado estables que presentan un tiempo más corto para el proceso de criodesecación y un contenido bajo de agua residual. Las composiciones desarrolladas pueden aplicarse a los virus adeno-asociados y otros tipos de virus no desarrollados.