

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 633 471**

51 Int. Cl.:

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 39/145 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

A61K 47/18 (2007.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2005** **E 14157639 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.04.2017** **EP 2769735**

54 Título: **Composiciones de vacuna contra la gripe estables a temperatura de refrigerador**

30 Prioridad:

06.10.2004 US 616711 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

21.09.2017

73 Titular/es:

MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
One Medimmune Way
Gaithersburg, MD 20878, US

72 Inventor/es:

KEMBLE, GEORGE;
TRAGER, GEORGE y
SCHWARTZ, RICHARD M

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 633 471 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones de vacuna contra la gripe estables a temperatura de refrigerador

5 Antecedentes de la invención

10 Las vacunas contra diversas cepas de gripe que evolucionan son importantes no solamente desde un punto de vista sanitario de una comunidad, sino también comercialmente, ya que cada año numerosos individuos están infectados con diferentes cepas y tipos de virus de la gripe. Los niños, los ancianos, aquellos sin un cuidado de la salud adecuado y las personas inmunocomprometidas están en riesgo especial de muerte por tales infecciones. Componiendo el problema de las infecciones de virus es que las cepas nuevas de virus evolucionan fácilmente, por lo tanto se necesita la producción continua de nuevas vacunas.

15 Se han producido numerosas vacunas capaces de producir una respuesta inmune protectora específica para tales virus de la gripe diferentes durante más de 50 años e incluyen, por ejemplo, vacunas de virus entero, vacunas de virus divididos, vacunas de antígenos de superficie y vacunas de virus vivos atenuados. Sin embargo, mientras que las formulaciones apropiadas de cualquiera de estos tipos de vacuna son capaces de producir una respuesta inmune sistémica, las vacunas de virus vivos atenuados tienen la ventaja de ser capaces también de estimular la inmunidad mucosa local en el tracto respiratorio. Una vacuna que comprenda un virus atenuado vivo que sea capaz de producirse rápida y económicamente y que tenga la capacidad de fácil almacenamiento/transporte es por lo tanto bastante deseable. Incluso más deseable sería una vacuna tal que tuviera la capacidad de almacenamiento/transporte a temperaturas de refrigerador (por ejemplo, aproximadamente 2-8 °C).

25 Hasta la fecha, todas las vacunas de la gripe disponibles en el mercado en EE.UU. se han propagado en huevos de gallina embrionados. Aunque el virus de la gripe crece bien en huevos de gallina, la producción de la vacuna depende de la disponibilidad de tales huevos. Debido a que el suministro de los huevos debe organizarse y las cepas para la producción de vacunas se seleccionan meses antes de la siguiente estación de gripe, la flexibilidad de esta aproximación puede estar limitada y normalmente resulta en retrasos y recortes en la producción y la distribución. Por lo tanto, los métodos para aumentar la estabilidad (por ejemplo, a temperaturas de refrigerador) de la vacuna producida son muy deseables ya que pueden prevenir el deterioro del almacén de la vacuna, que de otra manera necesitaría nueva producción, etc.

35 Los sistemas para producir virus de la gripe en cultivo celular también se han desarrollado en los años recientes (Véase, por ejemplo, Furminger. Vaccine Production, in Nicholson et al. (eds.) Textbook of Influenza pp. 324-332; Merten et al. (1996) Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation, en Cohen & Shafferman (eds.) Novel Strategies in Design and Production of Vaccines pp. 141-151); por lo tanto, cualquier método para aumentar la estabilidad de la composición de vacuna (por ejemplo, almacenamiento/transporte a temperatura de refrigerador) en estos sistemas son asimismo también muy deseables.

40 Se ha realizado un trabajo considerable en la producción del virus de la gripe para vacunas por los presentes inventores y los co-trabajadores; véase por ejemplo, las Solicitudes de Patente de EE.UU. n.º 60/375.675 enviada el 26 de abril, 2002, PCT/US03/12728 enviada el 25 de abril, 2003, 10/423.828 enviada el 25 de abril, 2003 y PCT/US05/017734 enviada el 20 de mayo, 2005.

45 La presente invención proporciona composiciones de vacuna que tienen estabilidad, por ejemplo, a temperaturas de refrigerador (por ejemplo, 4 °C) y métodos para producir la misma. Los aspectos de la presente invención son aplicables a métodos de producción de vacunas de huevos de gallina y nuevos cultivos celulares (y también sistemas combinados) y comprenden otros numerosos beneficios que serán evidentes tras la revisión de lo siguiente.

50

Sumario de la invención

La presente invención proporciona un método para fabricar una composición de virus adaptada al frío viva estable en el refrigerador como se define por la reivindicación 1 y las reivindicaciones dependientes de la misma.

55

La presente invención proporciona formulaciones de vacuna líquidas que son sustancialmente estables a temperaturas que varían de 4 °C a 8 °C. Estas y otras formulaciones líquidas, que son realizaciones específicas de la invención se hacen referencia en el presente documento, por ejemplo, como "formulaciones de vacuna de la presente invención", "formulaciones de vacuna estables al refrigerador", "formulaciones líquidas de la invención", "formulaciones de la invención", "formulaciones estables a temperatura del refrigerador (RTS, por sus siglas en inglés) de la invención" o simplemente "composiciones de la invención" o "composiciones víricas de la invención".

60

La presente invención enseña formulaciones de vacuna líquida que son sustancialmente estables a temperaturas que varían de 4 °C a 8 °C. En una realización específica de la invención, las formulaciones de vacuna líquidas de la invención son sustancialmente estables a temperaturas que varían de 4 °C a 8 °C durante un periodo de 3 meses, o 4 meses, o 5 meses, o 6 meses, o 9 meses, o 18 meses, o 24 meses, o 36 meses, o 48 meses, en que

65

hay una pérdida de potencia aceptable (por ejemplo, pérdida de potencia del virus de la gripe), por ejemplo, una pérdida de potencia de entre 0,5-1,0 logs, o menos de 0,5 logs, o menos de 1,0 logs de potencia, al final de tal tiempo.

En una realización, se proporcionan formulaciones de vacuna estables a refrigerador de la invención que comprenden los virus de la gripe. Por ejemplo, las formulaciones de la invención pueden comprender uno o más de los siguientes: un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a temperatura, un virus de la gripe sensible a temperatura adaptado al frío, un virus de la gripe A y un virus de la gripe B. En una realización, las formulaciones de vacuna líquidas de la invención comprenden dos cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B.

La presente invención enseña además composiciones inmunogénicas que comprenden formulaciones de la invención. La presente invención enseña además vacunas (por ejemplo, vacunas de la gripe) que comprenden formulaciones y composiciones inmunogénicas de la invención.

La presente invención enseña además métodos para producir tales formulaciones de vacuna líquidas. Por ejemplo, en una realización específica, se proporcionan en el presente documento métodos para producir formulaciones líquidas que comprenden uno o más virus de la gripe. En una realización específica, los métodos para producir una formulación líquida de la invención incluyen una o más de las siguientes etapas: 1) introducir una pluralidad de vectores [uno o más de los que incorpora (o codifica) una porción de un genoma del virus de la gripe] en una población de huevos hospedadores o en una población de células hospedadoras es capaz de soportar la replicación de un virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos hospedadores o células hospedadoras a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha vírica; 4) adición de un estabilizante (por ejemplo, soluciones que contienen glutamato y sacarosa descritas en el presente documento); 5) clarificar la cosecha vírica (por ejemplo, por filtración de profundidad o de membrana) produciendo de esta manera una cosecha vírica clarificada; 6) someter la cosecha vírica a una etapa de centrifugación (por ejemplo, centrifugación zonal continua, centrifugación de flujo continuo); 7) una etapa de filtración estéril (por ejemplo, uso de un filtro de 0,2 o 0,2-0,5 micrómetros (con o sin calentamiento durante la filtración)); y 8) almacenamiento a -60 grados C.

En otra enseñanza específica, los métodos para producir una formulación líquida de la invención incluye una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos hospedadores o en una población de células hospedadoras con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos hospedadores o la población de células hospedadoras a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha vírica; 4) adición de un estabilizante; 5) clarificar la cosecha vírica (por ejemplo, por filtración profunda y/o pasando a través de uno o más filtros que varían de 0,2-0,8 micrómetros; o 0,8 o 1,5 micrómetros seguido de 0,2 micrómetros), produciendo por lo tanto una cosecha vírica; 6) someter la cosecha vírica a una etapa de centrifugación (por ejemplo, centrifugación zonal continua, centrifugación de flujo continuo); 7) una etapa de filtración estéril (por ejemplo, uso de un filtro de 0,2 o 0,2-0,5 micrómetros (con o sin calentamiento durante la filtración)); y 8) almacenamiento a -60 grados C.

En otra enseñanza específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprende una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos hospedadores o en una población de células hospedadoras con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos hospedadores o la población de células hospedadoras a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha vírica; 4) clarificar la cosecha vírica por filtración, produciendo por lo tanto una cosecha vírica; 5) someter la cosecha vírica a una etapa de centrifugación (por ejemplo, centrifugación zonal continua, centrifugación de flujo continuo) ;6) adición de estabilizantes (por ejemplo, sacarosa al 2-8 %; monoclóhidrato de arginina al 0,75 % - 2 %; opcionalmente ácido glutámico al 0,02-0,15 %; e hidrolizado de gelatina al 0,5-2 %) y 6) esterilizar dicha cosecha vírica clarificada además por filtración.

En otra enseñanza específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden todas las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos hospedadores o en una población de células hospedadoras con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos hospedadores o la población de células hospedadoras a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha vírica; 4) clarificar la cosecha vírica por filtración, produciendo por lo tanto una cosecha vírica; 5) someter la cosecha vírica clarificada a centrifugación (por ejemplo, centrifugación de flujo continuo) produciendo de esta manera una cosecha vírica clarificada adicional; y 6) esterilizar dicha cosecha vírica clarificada además por filtración.

En otra enseñanza específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden todas las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos hospedadores o en una población de células hospedadoras con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos hospedadores o la población de células hospedadoras a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha vírica; 4) clarificar la cosecha vírica por filtración; 5) someter la cosecha vírica clarificada a centrifugación (por ejemplo, centrifugación de flujo continuo) produciendo de esta manera una cosecha vírica clarificada adicional; y 6) esterilizar dicha cosecha vírica clarificada además por filtración.

En otra enseñanza específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención

comprenden todas las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos hospedadores o en una población de células hospedadoras con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos hospedadores o la población de células hospedadoras a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha vírica; 4) clarificar la cosecha vírica; 5) someter la cosecha vírica clarificada a centrifugación; y 6) adición de estabilizantes (por ejemplo, sacarosa al 2-8 %; monoclóhidrato de arginina al 0,75 % - 2 %; opcionalmente ácido glutámico al 0,02-0,15 %; e hidrolizado de gelatina al 0,5-2 %).

Estos y otros objetivos y características de la invención se volverán más completamente evidentes cuando la siguiente descripción detallada se lee en conjunción con el apéndice de las figuras que acompañan.

Breve descripción de los dibujos

Figura 1: Muestra un diagrama de flujo que ilustra un Flujo de Proceso de CTM.

Figura 2: Muestra un diagrama de flujo que ilustra un Flujo de Proceso de CTM.

Figura 3: Muestra una tabla que ilustra Estudios de Carga Centrífuga y Temperatura.

Figura 4: Muestra una tabla que ilustra un Resumen de datos del ensayo QT.

Figura 5: Muestra una tabla que ilustra rendimientos promedio para un número de cepas de gripe.

Figura 6: Muestra una tabla con un resumen de los datos del ensayo QT para resultados de la prueba de liberación de lote monovalente.

Descripción detallada

La presente invención proporciona formulaciones de vacuna que son sustancialmente estables a temperaturas que varían de 4 °C a 8 °C. En una realización específica de la invención, las formulaciones de vacuna de la invención son sustancialmente estables a una temperatura que varía de 4-8 °C o 4 °C durante un periodo de al menos 3 meses, o al menos 4 meses, o al menos 5 meses, o al menos 6 meses, o al menos 9 meses, o al menos 18 meses, o al menos 24 meses, o al menos 36 meses, o al menos 48 meses, en que hay una pérdida de potencia aceptable (por ejemplo, pérdida de potencia del virus de la gripe) al final de tal tiempo, por ejemplo, una pérdida de potencia de menos de 1,0 log (como se mide, por ejemplo, por TCID₅₀ o Ensayo de Enfoque Fluorescente (FFA)).

La presente invención proporciona además composiciones que comprenden formulaciones de la invención. La presente invención proporciona además vacunas (por ejemplo, vacunas de la gripe) que comprenden formulaciones y/o composiciones inmunogénicas de la invención.

De acuerdo con la invención, se proporcionan formulaciones de vacuna líquidas de la invención que comprenden virus de la gripe vivos. Por ejemplo, las formulaciones de la invención pueden comprender uno o más de los siguientes: un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a temperatura, un virus de la gripe sensible a temperatura adaptado al frío, un virus de la gripe A y un virus de la gripe B. En una realización, las formulaciones de vacuna líquidas de la invención comprenden dos cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B.

La presente invención enseña además métodos para producir tales formulaciones de vacuna líquidas. Por ejemplo, en una realización específica, se proporcionan en el presente documento métodos para producir formulaciones líquidas que comprenden uno o más virus de la gripe. En una realización específica, los métodos para producir una formulación líquida de la invención incluyen una o más de las siguientes etapas: 1) introducir una pluralidad de vectores [uno o más de los que incorpora (o codifica) una porción de un genoma del virus de la gripe] en una población de huevos hospedadores o en una población de células hospedadoras, cuya población de huevos hospedadores o células hospedadoras es capaz de soportar la replicación de un virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos hospedadores o células hospedadoras a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha vírica; 4) adición de un estabilizante (por ejemplo, soluciones que contienen glutamato y sacarosa descritas en el presente documento); 5) clarificar la cosecha vírica (por ejemplo, por filtración de profundidad o de membrana) produciendo de esta manera una cosecha vírica clarificada; 6) someter la cosecha vírica a una etapa de centrifugación (por ejemplo, centrifugación zonal continua, centrifugación de flujo continuo); 7) una etapa de filtración estéril (por ejemplo, uso de un filtro de 0,2 o 0,2-0,5 micrómetros (con o sin calentamiento durante la filtración)); y 8) almacenamiento a -60 grados C.

En otra enseñanza específica, los métodos para producir una formulación líquida de la invención incluye una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos hospedadores o en una población de células hospedadoras con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos hospedadores o la población de células hospedadoras a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha vírica; 4) adición de un estabilizante; 5) clarificar la cosecha vírica (por ejemplo, por filtración profunda y/o pasando a través de uno o más filtros que varían de 0,2-0,8 micrómetros; o 0,8 o 1,5 micrómetros seguido de 0,2 micrómetros), produciendo por lo tanto una cosecha vírica; 6) someter la cosecha vírica a una etapa de centrifugación (por ejemplo, centrifugación zonal continua, centrifugación de flujo continuo); 7) una etapa de filtración estéril (por ejemplo, uso de un filtro de 0,2 o 0,2-0,5 micrómetros (con o sin calentamiento durante la filtración)); y 8) almacenamiento a -60 grados C.

En otra enseñanza específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprende una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos hospedadores o en una población de células hospedadoras con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos hospedadores o la población de células hospedadoras a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha vírica; 4) clarificar la cosecha vírica por filtración, produciendo por lo tanto una cosecha vírica; 5) someter la cosecha vírica a una etapa de centrifugación (por ejemplo, centrifugación zonal continua, centrifugación de flujo continuo); 6) adición de estabilizantes (por ejemplo, sacarosa al 2-8 %; monoclóridato de arginina al 0,75 % - 2 %; opcionalmente ácido glutámico al 0,02-0,15 %; e hidrolizado de gelatina al 0,5-2 %) y 6) esterilizar dicha cosecha vírica clarificada además por filtración.

En otra enseñanza específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden todas las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos hospedadores o en una población de células hospedadoras con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos hospedadores o la población de células hospedadoras a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha vírica; 4) clarificar la cosecha vírica por filtración, produciendo por lo tanto una cosecha vírica; 5) someter la cosecha vírica clarificada a centrifugación (por ejemplo, centrifugación de flujo continuo) produciendo de esta manera una cosecha vírica clarificada adicional; y 6) esterilizar dicha cosecha vírica clarificada además por filtración.

En otra enseñanza específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden todas las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos hospedadores o en una población de células hospedadoras con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos hospedadores o la población de células hospedadoras a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha vírica; 4) clarificar la cosecha vírica por filtración; 5) someter la cosecha vírica clarificada a centrifugación (por ejemplo, centrifugación de flujo continuo) produciendo de esta manera una cosecha vírica clarificada adicional; y 6) esterilizar dicha cosecha vírica clarificada además por filtración.

En otra enseñanza específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprende una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos hospedadores o en una población de células hospedadoras con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos hospedadores o la población de células hospedadoras a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha vírica; 4) clarificar la cosecha vírica; y 5) someter la cosecha vírica clarificada a centrifugación.

En otra enseñanza específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden todas las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos hospedadores o en una población de células hospedadoras con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos hospedadores o la población de células hospedadoras a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha vírica; 4) clarificar la cosecha vírica; 5) someter la cosecha vírica clarificada a centrifugación; y 6) adición de estabilizantes (por ejemplo, sacarosa al 2-8 %; monoclóridato de arginina al 0,75 % - 2 %; opcionalmente ácido glutámico al 0,02-0,15 %; e hidrolizado de gelatina al 0,5-2 %).

En una enseñanza, los métodos para producir una formulación líquida de la invención pueden incluir la etapa de congelar tales formulaciones. La etapa de congelado puede realizarse, por ejemplo, antes del ensayo de estabilidad final y la distribución y/o antes de almacenar a temperaturas de refrigerador (por ejemplo, 4-8 grados Celsius). Congelar las formulaciones de vacuna antes del almacenaje a temperaturas de refrigerador puede aumentar la estabilidad de las formulaciones de vacuna de la invención al menos un 10 %, o al menos un 20 %, o al menos un 30 %, o al menos un 40 %, o al menos un 50 %, o al menos un 80 %.

La invención enseña además métodos para producir una o más composiciones del virus de la gripe filtrado en una cosecha de virus de la gripe, por lo que la cosecha del virus se calienta durante el filtrado. Incluido en estas realizaciones específicas, el filtrado comprende el pasaje de la composición a través de un microfiltro de un tamaño de poro que varía de 0,2 micrómetros a aproximadamente 0,45 micrómetros. Adicionalmente, en diversas realizaciones, la temperatura de calentamiento en tales realizaciones opcionalmente comprende de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 40 °C o más, mientras que en algunas realizaciones, la temperatura comprende 31 °C o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 32 °C. El calentamiento en tales realizaciones ocurre opcionalmente antes o durante o antes y durante la filtración y opcionalmente comprende de aproximadamente 50 minutos a aproximadamente 100 minutos, de aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 90 minutos o aproximadamente 60 minutos. La invención también proporciona una composición del virus de la gripe producida por tales métodos (incluyendo en el que la composición es una composición de vacuna).

Estabilizantes y tampones

Los estabilizantes de la invención incluyen, arginina al 0,75-2 %; sacarosa (por ejemplo, 2-8 %); gelatina hidrolizada al 0,5-2 %; y glutamato (por ejemplo, 0,02-0,15 %).

Los tampones de la invención incluyen, por ejemplo, uno o más de los siguientes: tampón fosfato (mono o dibásico o

ambos) (por ejemplo, 10-200mM, pH 7-7,5; 100 mM, pH 7,2; 100 mM, pH 7-7,3); y tampones histidina (por ejemplo histidina 25 - 50 mM, pH 7-7,5, histidina 50-100 mM, pH 7-7,5).

Rendimiento del proceso

En una enseñanza, los métodos para producir una formulación líquida de los resultados de la invención resultan en un rendimiento de proceso real o promedio (de Cosecha Vírica (VH) a formulación final) de menos del 10 %, de menos del 16 %, de menos del 20 %, de menos del 30 %, de menos del 40 %, de menos del 50 %, de menos del 60 %, de menos del 70 %, de menos del 80 %, de menos del 90 %, o menos del 93 %, de menos del 95 %.

Se apreciará por aquellos expertos en la materia que las diversas etapas de los métodos descritos en el presente documento no requieren realizarse o requieren existir en la misma serie de producción. De esta manera, aunque en algunas enseñanzas preferidas, todas las etapas y/o las composiciones en el presente documento se realizan o existen, en otras realizaciones, una o más etapas se cambian, omiten, por ejemplo, opcionalmente (en alcance, orden, lugar, etc.) o similares.

También se apreciará por aquellos expertos en la materia que las enseñanzas típicas comprenden etapas/métodos/composiciones que se conocen en la técnica, por ejemplo, velado de los huevos que contienen virus, inoculación de huevos con virus, etc. Por lo tanto, aquellos expertos en la materia son fácilmente capaces de determinar condiciones, sub-etapas, detalles de etapas, etc., apropiadas para tales etapas conocidas para producir los virus, soluciones de virus, composiciones, etc. apropiados esencialmente estables a 2-8 °C. Las etapas individuales se describen con mayor detalle a continuación.

Además, la presente invención enseña métodos para usar tales formulaciones de vacuna líquidas. Por ejemplo, las formulaciones de vacuna pueden administrarse a un humano para prevenir o reducir los efectos de una infección vírica, por ejemplo, infección de la gripe. En un ejemplo, las formulaciones de la invención se administran como una composición inmunogénica para prevenir o reducir los efectos de una infección del virus de la gripe.

Formulaciones CAIV estables al refrigerador

El trabajo anterior por el inventor y los co-trabajadores han resultado en el desarrollo de una vacuna de la gripe trivalente, viva, adaptada al frío (CAIV-T, FluMist®, que se hace referencia a través de todo como FluMist, pero debe asumirse ser FluMist®) administrado por pulverizador nasal. La presente invención implica el desarrollo de una formulación de CAIV-T, que tiene un perfil de estabilidad mejorado a temperaturas refrigeradas. Los métodos para producir tales formulaciones mejoradas se proporcionan en el presente documento y pueden incluir una o más de las siguientes etapas: una etapa de filtración estéril para reducir el riesgo de contaminación, ultracentrifugación (por ejemplo, centrifugación zonal de velocidad) y diafiltración. Además, se incluye en el presente documento un número de métodos para producir FluMist líquido y otras formulaciones estables a temperaturas de refrigerador de la invención.

El desarrollo de las cepas CAIV se asistió por el Dr. John Maassab de la Universidad de Michigan en los 90 quien pasó en serie cepas de gripe A y B en células PKC a temperaturas en disminución hasta que las cepas resultantes mostraron de forma reproducible las propiedades fenotípicas de la adaptación al frío (el virus crece bien a temperaturas reducidas en comparación con el virus de tipo silvestre), sensibilidad a temperatura (el virus no crece bien a temperaturas elevadas *in vitro*) y atenuación (la replicación del virus se restringe en hurones). A través del desarrollo por ejemplo, por el inventor y los cotrabajadores, estas propiedades se usaron como la base para el desarrollo de una vacuna trivalente anual que refleja las cepas de vacunas designadas de CDC para un año particular, a través de los procesos de reorganización genética 6:2. Por ejemplo, una cepa CAIV 6:2 se produce por co-infección *in vitro* de la cepa relevante A o B del Virus Donante Maestro (MDV, por sus siglas en inglés) con la cepa de gripe circulante de interés y la selección mediada por anticuerpo de la reorganización apropiada. La reorganización diana 6:2 contiene genes HA y NA de la cepa circulante y los genes restantes del Virus Donante Maestro (MDV). La reorganización retiene las propiedades fenotípicas adaptadas al frío descritas anteriormente. El desarrollo adicional de CAIV se ha llevado a cabo por los presentes inventores y los cotrabajadores. FluMist ha demostrado un perfil seguro y muestra una eficiencia contra el desafío vírico y está aprobado para el uso farmacéutico comercial en muchas situaciones.

La formulación original de FluMist contenía cosecha de virus (VH) producida infectando huevos de gallina libres de patógeno específico con la Semilla del Virus del Trabajador del Fabricante (MWVS, por sus siglas en inglés) de la cepa seleccionada, seguido de incubación durante dos a tres días y cosechar fluido alantoico infectado. El VH se estabilizó por la adición a un volumen 1/10 de una solución de glutamato fosfato de sacarosa (SPG) 10X. El FluMist trivalente se produjo combinando VH de cada una de las tres cepas en las vacunas durante un año dado con fluido alantoico normal estabilizado (NAF) a una concentración diana de 7,3 log₁₀TCID₅₀/ml de cada cepa. La mezcla resultante después se llenó en pulverizadores ajustados con una punta de pulverizador para permitir el transporte intranasal de la vacuna FluMist. Este formato de producto se usó como "FluMist congelado", que se almacenó en una forma congelada. Se apreciará que el virus MWVS también podría fabricarse opcionalmente por ejemplo por reorganización de plásmido. Véase, por ejemplo, las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 60/375.675 enviada el 26

de abril, 2002, PCT/US03/12728 enviada el 25 de abril, 2003, 10/423,828 enviada el 25 de abril, 2003, PCT/US05/017734 enviada el 20 de mayo, 2005 y US20050186563.

Aunque FluMist congelado puede servir como una vacuna marcada cuando se congela después de la fabricación y mantenerla congelada hasta el momento de uso, es bastante deseable una forma de FluMist que sea estable para el transporte/almacenaje a temperaturas de refrigerador. Tales formas "estables a temperatura de refrigerador" (o RTS) se caracterizan por una o más (pero no necesariamente todas en cada realización) de las siguientes: retención de estabilidad cuando se distribuyen como un líquido refrigerado; se pasan a través de filtros esterilizantes (por ejemplo, 0,2 micrómetros) para asegurar la garantía de un producto estéril (por ejemplo, sustancialmente libre de NAF); han eliminado la necesidad de la fabricación del diluyente de NAF; tener un volumen de una dosis reducido; y comprende uno o ambos de arginina y gelatina como excipientes (por ejemplo, como estabilizantes). En ciertos aspectos en el presente documento, las formulaciones que tienen una o más de tales características se denominan "FluMist líquido" o RTS o diversos términos similares, para distinguirlas de otras versiones de la vacuna CAIV-T, tales como congeladas. La presente invención presenta estos y otros aspectos.

Al producir/ensayar una composición de virus RTS líquida de la presente invención, se llevaron a cabo numerosos lotes de desarrollo. Los lotes de desarrollo variaron de 2000 a 20.000 huevos por lote, mientras que los lotes de GMP fueron aproximadamente 10.000 huevos cada uno. Se apreciará que mientras que los diversos ejemplos y protocolos se dan en el presente documento para la producción de virus MWVS (por ejemplo, reordenamientos), los virus se producen opcionalmente a través de diferentes medios en diferentes realizaciones. Por ejemplo, en ciertas realizaciones, los virus en el presente documento se fabrican a través de los protocolos mostrados en el presente documento, mientras que en otras realizaciones, los virus MWVS se fabrican opcionalmente a través de, por ejemplo, reorganización de plásmido o tecnologías de "rescate de plásmidos". Véase, por ejemplo, las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 60/375.675 enviada el 26 de abril, 2002, PCT/US03/12728 enviada el 25 de abril, 2003, USSN 10/423.828 enviada el 25 de abril, 2003, PCT/US05/017734 enviada el 20 de mayo, 2005 y US20050186563. En consecuencia, como se usa en el presente documento "infección de una población de células hospedadoras" abarca células hospedadoras infectadas por virus creados por o durante reorganizamiento de plásmido.

En diversas realizaciones, la invención comprende composiciones de virus y vacunas que son sustancialmente estables, por ejemplo, no muestran pérdidas inaceptables en la potencia, por ejemplo, pérdida de potencia de menos de 1,0 log, durante periodos de tiempo seleccionados (normalmente durante al menos 3 meses, durante al menos 4 meses, durante al menos 5 meses, durante al menos 6 meses, durante al menos 7 meses, durante al menos 8 meses, durante al menos 9 meses, durante al menos 10 meses, durante al menos 11 meses, durante al menos 12 meses, durante al menos 13 meses, durante al menos 14 meses, durante al menos 15 meses, durante al menos 16 meses, durante al menos 17 meses, durante al menos 18 meses, durante al menos 19 meses, durante al menos 20 meses, durante al menos 21 meses, durante al menos 22 meses, durante al menos 23 meses, durante al menos 24 meses o durante más de 24 meses, etc.) a temperaturas deseadas (por ejemplo normalmente 4 °C, 5 °C, 8 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 8 °C).

Aunque un número de realizaciones de la invención en el presente documento se ejemplifican o se ilustran con FluMist, los principios realizados por la invención son aplicables a otras composiciones de virus/vacunas así como no deben necesariamente limitarse a cepas/virus particulares del presente documento. De esta manera otros virus de la gripe atenuados vivos y vacunas y composiciones también están dentro de la visión de la invención, por ejemplo, unas creadas a través de medios racionales, por intervención humana, etc. También, otros virus de otras cepas de la gripe, por ejemplo, tales como cepas de la gripe A, cepas de la gripe B, cepas de la gripe atenuadas y no atenuadas, cepas de la gripe adaptadas al frío y no adaptadas al frío, cepas de la gripe sensibles a temperatura y no sensibles a temperatura, etc. están todas opcionalmente dentro de las realizaciones de la presente invención. Pueden usarse tales otros virus y vacunas, por ejemplo, como nuevas vacunas y/o como controles para ensayar otra vacuna bien en humanos o animales, etc. Además, otras composiciones de vacuna vírica oral particularmente aquellas que comprenden virus vivos crecidos en células o huevos de gallina (por ejemplo, el virus del sarampión) son realizaciones de la invención. Adicionalmente, los principios realizados por la invención también son ampliamente aplicables a composiciones de virus y vacuna que comprenden virus vivos crecidos en células de mamífero. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. 6.244.354; 6.146.873; y 6.656.720.

Producción de cosecha de virus en lote

La purificación del virus de la gripe adaptado a frío (u otros virus similares) y la formulación real de las composiciones son características de RTS, o composiciones de virus, líquidas. La separación del virus de la gripe del fluido alantoico se ha practicado como una parte de los procesos comerciales para la fabricación de vacunas inactivadas. El método de elección para tal vacuna inactivada ha sido la ultracentrifugación. La ultracentrífuga de flujo continuo a escala comercial se volvió disponible en 1969 y se aplicó rápidamente a la preparación de vacunas de la gripe inactivadas. Aunque la purificación cromatográfica de virus de la gripe vivos sería una alternativa atractiva, los procesos robustos a gran escala que retengan la actividad vírica todavía no están disponibles. Esto se cree que se debe al recubrimiento de membrana y la naturaleza pleiomórfica de la partícula del virus de la gripe.

La recuperación del virus vivo (en oposición al virus inactivado) purificado por ultra-centrifugación se logró por los

inventores y los cotrabajadores y es una realización de la presente invención. El trabajo adicional demostró la capacidad de la filtración en profundidad como una alternativa comercialmente viable a la centrifugación en cubo oscilante antes de la ultra-centrifugación y las recuperaciones aceptables de virus vivos después de la filtración a través de un filtro de 0,2 micrómetros y de nuevo tal es una realización de la presente invención.

5 En una realización específica, el rendimiento del proceso medio para la etapa de clarificación de VH de los métodos de la invención es al menos el 30 %, o al menos el 40 %, o al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70 %, o al menos el 80 % o al menos el 90 %.

10 En otra realización específica, el rendimiento del proceso medio para la etapa de ultracentrifugación (por ejemplo, centrifugación zonal) de los métodos de la invención es al menos el 30 %, o al menos el 40 %, o al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70 %, o al menos el 80 % o al menos el 90 %.

15 En otra realización específica, el rendimiento medio del proceso para la dilución pico y la etapa de filtración estéril de los métodos de la invención es al menos el 30 %, o al menos el 40 %, o al menos el 50 %, o al menos el 60 %, o al menos el 70 %, o al menos el 80 % o al menos el 90 %.

La etapa de ultra-centrifugación proporciona el beneficio de concentrar el CAIV. Esto soporta el uso de un volumen enviado más pequeño (0,1 ml por fosa nasal en lugar de 0,25 ml por fosa nasal, por ejemplo, como puede usarse para FluMist congelado). Tal volumen reducido es más típico de productos administrados nasalmente y puede aumentar la aceptación del consumidor y reducir las pérdidas de producto debidas al tragado o el goteo de la vacuna fuera de la nariz. Los títulos de cosecha del fluido alantoico infectado para CAIV han estado normalmente entre 8,3 y 9,5 log₁₀TCID₅₀/ml, que es más que una orden de magnitud por encima de la concentración del producto diana para FluMist congelado (7,3 log₁₀ TCID₅₀/ml o 7,0 log₁₀ TCID₅₀ por dosis). En el caso en el que se incluya una cepa de muy baja titulación en la recomendación de vacuna anual, un FluMist líquido o RTS mejora las probabilidades de producir una vacuna trivalente de fuerza completa a pesar de la concentración de virus aumentada en el producto final en comparación con FluMist congelado. FluMist líquido o RTS se formula opcionalmente a una concentración fila de 7,7 log₁₀ TCID₅₀/ml, que envía la misma cantidad de virus vivo por dosis como FluMist congelado.

30 En una realización específica, se proporciona una composición de vacuna de la gripe de baja titulación en la que la titulación es menos de 7,3 log₁₀ TCID₅₀/ml, o menos de 7,0 log₁₀ TCID₅₀/ml, o menos de 6,0 log₁₀ TCID₅₀/ml, o menos de 5,0 log₁₀ TCID₅₀/ml, o menos de 4,0 log₁₀ TCID₅₀/ml, o menos de 3,0 log₁₀ TCID₅₀/ml, o menos de 2,0 log₁₀ TCID₅₀/ml. Tales composiciones de vacuna de la gripe de baja titulación pueden comprender además un adyuvante farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, toxina termolábil de *E. coli* (o fragmentos de la misma), toxina pertusis, aluminio. Otros adyuvantes incluyen, pero no se limitan a fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, MPL.TM. (monofosforil lípido A 3-O-desacetilado); RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont., ahora Corixa), análogos del lípido A sintéticos tales como 529 (Corixa), Stimulon.TM. QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, Mass.), IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, Mass.), polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un motivo CpG (Pat. de EE.UU. N.º 6.207.646 (28)) y toxina colérica (bien en una forma tipo silvestre o bien mutante, por ejemplo, donde el ácido glutámico en la posición de aminoácido 29 se reemplaza por otro aminoácido, preferentemente una histidina, de acuerdo con la solicitud de patente internacional publicada número WO 00/18434).

45 En una realización específica, la diafiltración puede usarse en la preparación de composiciones de virus de la invención. Por ejemplo, la diafiltración puede usarse para concentrar el virus antes de la formulación. La diafiltración puede usarse además de o en lugar de la ultracentrifugación.

Después de una fase inicial descrita más adelante en el presente documento, la producción de cGMP se inició en la escala de 10.000 huCAIV monovalentes purificados A/Beijing/262/95 (H1N1), A/Sídney/05/97 (H3N2) y B/Ann Arbor/1/94 (tipo B/harbin/7/94) se fabricaron para soportar posteriores pruebas clínicas. La cepa B/Ann Arbor se denomina en lo sucesivo en el presente documento tipo B/Harbin/7/94. Por conveniencia, las designaciones de las cepas normalmente se abrevian (por ejemplo, A/Beijing). La presente solicitud describe más fuertemente etapas de proceso únicas al FluMist líquido, sin embargo, las etapas implicadas en ambas o comunes tanto a FluMist líquido como congelado también se describen en el presente documento.

Los métodos para el manejo de los huevos y la preparación de cosecha de virus reciente fueron esencialmente los mismos en diversas realizaciones de la presente invención (con la excepción de inoculación y cosecha automatizadas) para FluMist congelado como para FluMist líquido y aquellos expertos en la materia estarán advertidos de etapas similares o equivalentes que son capaces de usarse con la presente invención. En la presente invención, la ultra-centrifugación se realizó usando una centrífuga zonal Hitachi CP40Y y un rotor de flujo continuo RP40CT Tipo D (volumen de rotor = 3,2 l). La cosecha de virus primero se puso en conjunto, se estabilizó con glutamato de fosfato sacarosa (SPG) para facilitar la filtración, después se pasó a través de un filtro de polipropileno de 5 micrómetros. El filtrado después se cargó sobre un gradiente de sacarosa del 10 % al 60 %, se bandeó durante una hora a 40.000 rpm y se eluyó en fracciones de 100 ml.

Las fracciones que contienen altos niveles de hemaglutinina (HA) se pusieron en conjunto, se diluyeron a concentración de sacarosa 0,2 M y después se filtraron estériles usando un filtro de 0,2 micrómetros de fluoruro de polivinilideno (PVDF). El CAIV monovalente purificado en lote resultante se congeló en botellas de 1 l por debajo de -60 grados C y se mantuvo para procesamiento adicional.

Formulación y carga

El barrido de la formulación inicial determinó que la estabilidad de la fase líquida de CAIV purificado a temperaturas refrigeradas era adecuada para la vacuna anual. Se añadió gelatina de animal hidrolizada al estabilizante SPG de FluMist congelado y proporcionó los mejores resultados de estabilidad, con una cepa menos estable y un lote de la campaña de CTM-1 mostró una pérdida de un log durante 6,9 meses. Estudios de desarrollo de la formulación adicionales mostraron que la estabilidad del FluMist líquido podría mejorarse adicionalmente almacenando congelado justo después de la fabricación y descongelando antes de la distribución final. La estabilidad de la cepa del peor caso también se mejoró mediante la adición de arginina. Mientras las gelatinas animales pueden elevar la conciencia con respecto a las encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE), las formulaciones disponibles que carecen de gelatina no lograron la estabilidad requerida en todas las realizaciones. De esta manera, se eligió gelatina porcina para las algunas realizaciones de formulación de FluMist líquido debido a sus propiedades estabilizantes y el hecho de que no se han informado apariciones de TSE en cerdos. Las etapas de procesamiento químico rigurosas usadas en la hidrólisis del colágeno también se cree que causan inactivación de proteínas de tamaño prion.

Se envió CAIV en lote monovalente purificado congelado y se produjo una vacuna trivalente bajo cGMP para soportar el ensayo clínico de FluMist líquido. Se realizaron un total de seis cargas. La combinación se realizó a pequeña escala usando un matraz aspirador de vidrio de 4 litros y se cargaron pulverizadores de vidrio de 0,5 ml Becton Dickinson (BD) Hypack SCF (estéril, limpio, listo para cargar) usando un cargador/parador INOVA automatizado y equipo asociado. La fabricación de FluMist líquido trivalente cargado se describe con más detalle a continuación.

Realizaciones de formulación específicas de la invención

De acuerdo con la invención, las formulaciones de vacuna de la invención comprenden en las formulaciones finales: sacarosa: 2-8 % peso/volumen (p/v); arginina (tal como monoclóhidrato) 0,75 % - 2 % p/v; opcionalmente monohidrato monosódico de ácido glutámico, 0,02-0,15 % p/v; hidrolizado de gelatina, tal como porcina Tipo A (u otras fuentes) 0,5-2 % p/v; opcionalmente fosfato potásico dibásico 1-2 %; y fosfato potásico monobásico 0,25-1 % p/v.

En una realización específica, las formulaciones de vacuna comprenden lo siguiente: sacarosa: 6,84 % (p/v); monoclóhidrato de arginina 1,21 % (p/v); ácido glutámico, monohidrato monosódico 0,094 p/v; hidrolizado de gelatina, porcina Tipo A (u otras fuentes) 1 % (p/v); fosfato potásico dibásico 1,13 % y fosfato potásico monobásico 0,48 % p/v. En otra realización específica, las formulaciones de vacuna comprenden todos de los siguientes: sacarosa: 6,84 % peso/volumen (p/v); monoclóhidrato de arginina 1,21 % (p/v); ácido glutámico, monohidrato monosódico 1 p/v; hidrolizado de gelatina, porcina Tipo A (u otras fuentes) 1 % (p/v); fosfato potásico dibásico 1,13 % y fosfato potásico monobásico 0,48 % p/v.

En otra realización específica, las formulaciones de vacuna comprenden todos los siguientes (con un 10 % de variación de uno o más componentes): sacarosa: 6,84 % peso/volumen (p/v); monoclóhidrato de arginina 1,21 % (p/v); ácido glutámico, monohidrato monosódico 0,094 p/v; hidrolizado de gelatina, porcina Tipo A (u otras fuentes) 1 % (p/v); fosfato potásico dibásico 1,13 % y fosfato potásico monobásico 0,48 % p/v.

En otra realización específica, las formulaciones de vacuna comprenden todos los siguientes (con un 10 % de variación de uno o más componentes): sacarosa: 6,84 % peso/volumen (p/v); monoclóhidrato de arginina 1,21 % (p/v); hidrolizado de gelatina porcina Tipo A (u otras fuentes) 1 % (p/v). En tales realizaciones, las formulaciones están en tampón (por ejemplo, un tampón fosfato potásico (pH 7,0-7,2).

En otra realización específica, las formulaciones de vacuna comprenden todos los siguientes (con un 1 % de variación de uno o más componentes): sacarosa: 6,84 % peso/volumen (p/v); monoclóhidrato de arginina 1,21 % (p/v); ácido glutámico, monohidrato monosódico 0,094 p/v; hidrolizado de gelatina, porcina Tipo A (u otras fuentes) 1 % (p/v); fosfato potásico dibásico 1,13 % y fosfato potásico monobásico 0,48 % p/v.

En otra realización específica, las formulaciones de vacuna comprenden todos los siguientes (con un 3 % de variación de uno o más componentes): sacarosa: 6,84 % peso/volumen (p/v); monoclóhidrato de arginina 1,21 % (p/v); ácido glutámico, monohidrato monosódico 0,094 p/v; hidrolizado de gelatina, porcina Tipo A (u otras fuentes) 1 % (p/v); fosfato potásico dibásico 1,13 % y fosfato potásico monobásico 0,48 % p/v.

En una realización específica, las formulaciones de la invención pueden contener, por ejemplo, fosfato potásico (por ejemplo, al menos 50 mM, o al menos 100 mM, o al menos 200 mM, o al menos 250 mM) como un tampón fosfato, o

alternativamente, histidina (por ejemplo, al menos 50 mM, o al menos 100 mM, o al menos 200 mM, o al menos 250 mM).

Otras realizaciones específicas de la invención, por ejemplo, dosificación, potencia

En otra realización específica, se incluyen métodos para administrar las formulaciones de vacuna de la invención intranasalmente. Por ejemplo, las formulaciones de vacuna de la invención pueden administrarse intranasalmente en dosis finales de 0,5 ml/dosis; 0,75 ml/dosis; 0,1 ml/dosis; 0,15 ml/dosis; 0,2 ml/dosis; 0,25 ml/dosis; 0,5-0,1 ml/dosis; 0,5 ml-2 ml/dosis; o 0,5-2,5 ml/dosis.

En una realización, las formulaciones de vacuna de la invención comprenden aproximadamente 10^7 unidades de enfoque fluorescentes (FFU) o 10^7 TCID₅₀ de cada una de tres cepas de reorganización diferentes de la gripe. En otra realización específica de la invención, las formulaciones de vacuna de la invención comprenden una potencia de 7,0 (+/- 0,5) log₁₀ FFU/dosis (o TCID₅₀/dosis) para cada cepa del virus de la gripe. En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención tienen una potencia de 7,0 (+/- 0,5) log₁₀ FFU/dosis (o TCID₅₀/dosis) para al menos una cepa del virus de la gripe. En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención tienen una potencia de al menos (o igual a) 6,0 log₁₀ FFU/dosis, 6,5 log₁₀ FFU/dosis, 6,7 log₁₀ FFU/dosis, 6,7 log₁₀ FFU/dosis, 6,8 log₁₀ FFU/dosis, 6,9 log₁₀ FFU/dosis, 7,0 log₁₀ FFU/dosis, 7,1 log₁₀ FFU/dosis, 7,2 log₁₀ FFU/dosis, 7,3 log₁₀ FFU/dosis, 7,4 log₁₀ FFU/dosis, 7,5 log₁₀ FFU/dosis, 7,6 log₁₀ FFU/dosis, 7,7 log₁₀ FFU/dosis, 7,8 log₁₀ FFU/dosis, 7,9 log₁₀ FFU/dosis, 8,1 log₁₀ FFU/dosis, 8,5 log₁₀ FFU/dosis u 8,8 log₁₀ FFU/dosis.

La potencia puede medirse por TCID₅₀ en lugar de FFU en cada realización de la invención. Un Ensayo de enfoque fluorescente (FFA) es una medida directa de la capacidad de infección en la vacuna mientras que TCID₅₀ es una medida indirecta que mide la capacidad de la replicación productiva en MDCK u otras células.

En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención tienen una potencia de entre 6,5-7,5 log₁₀ FFU por dosis (por ejemplo, por 0,2 ml de dosis).

En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención tienen una potencia de al menos (o igual a) 7,0 log₁₀ TCID₅₀ por dosis, o al menos 6-8 TCID₅₀ por dosis, o al menos 6,4 TCID₅₀ por dosis, o al menos 6,6 log₁₀ TCID₅₀ por dosis.

En una realización, las formulaciones de vacuna de la invención tienen pH de 6,7-7,7, o 6,6, o 6,7, o 6,8, o 6,9, o 7,0, o 7,1, o 7,2, o 7,3, o 7,4, o 7,5, o 7,6, o 7,7.

En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención no tienen más de 60 EU/ml de endotoxina, o no tienen más de 200 EU/ml de endotoxina. Por ejemplo, las formulaciones de vacuna de la invención tienen menos de o igual a 5 EU/ml de endotoxina. En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención tienen menos de o igual a 1,0 EU/7,0 log₁₀ FFU.

En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención están libres de uno o más (o todos) de los siguientes; micoplasma, retrovirus, virus de la leucosis aviar y micobacteria (por ejemplo, *M. tuberculosis*). Los métodos para producir tales formulaciones de la invención pueden comprender la etapa o etapas de ensayar para tales impurezas.

En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención pueden contener virus de la gripe que tienen genes HA y NA de tres virus diferentes como en FluMist.

En una realización específica, las formulaciones de la invención comprenden todos de los siguientes por dosis (por ejemplo, por 0,2 ml de dosis): sacarosa (13,68 mg), fosfato potásico dibásico (2,26 mg), fosfato potásico monobásico (0,96 mg), hidrolizado de gelatina (2,0 mg), clorhidrato de arginina (2,42 mg) y glutamato monosódico (0,188 mg).

En una realización específica, las formulaciones de la invención comprenden todos de los siguientes por dosis (por ejemplo, por 0,2 ml de dosis): sacarosa (13,68 mg), fosfato potásico (100 mM), hidrolizado de gelatina (2,0 mg), clorhidrato de arginina (2,42 mg) y glutamato monosódico (0,188 mg).

En otra realización específica, las formulaciones de la invención comprenden un virus de la gripe que comprende el esqueleto genético de uno o más de los siguientes virus de la gripe: virus A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60) B/Ann Arbor/1/66, el FluMist MDV-A (ca A/Ann Arbor/6/60), el FluMist MDV-B (ca B/Ann Arbor/1/66), esqueleto de cepa donante A/Leningrado/17 y PR8.

En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención comprenden un virus de la gripe que comprende una secuencia polipeptídica HA y una NA (o al menos un 90 % idénticas o al menos un 95 % idénticas a tales secuencias) de uno o más de los siguientes: B/Yamanashi; A/Nueva Caledonia; A/Sidney; A/Panamá; B/Johannesburgo; B/Victoria; B/Hong Kong; A/Shandong/ 9/93; A/Johannesburgo/33/94; A/Wuhan/395/95;

A/Sídney/05/97; A/Panamá/2007/99; A/Wyoming/ 03/2003; A/Texas/36/91; A/Shenzhen/227/95; A/Beijing/262/95; A/Nueva Caledonia/20/99; B/Ann Arbor/1/94; B/Yamanashi/166/98; B_Johannesburgo_5_99; B/Victoria/504/2000; B/Hong Kong/330/01; B_Brisbane_32_2002; B/Jilin/20/03; un virus de la gripe A H1N1, un virus de la gripe A H3N2, un virus de la gripe A H9N2 y una cepa de gripe pandémica (bien designada por WHO o que no circula en la población humana). Véase, por ejemplo, el documento US 20050042229.

En otro ejemplo específico, las formulaciones de vacuna de la invención son estériles.

Descripción de etapas representativas en la producción de vacunas

Para la facilidad en el análisis y la descripción, las diversas etapas de la producción de vacunas en general pueden enseñarse comprendiendo o cayendo en los presentes cuatro grupos amplios (a groso modo similar a la presentación indicada previamente antes). El primer grupo comprende tales aspectos como co-infección, reagrupación, selección de reordenaciones y clonación de reordenaciones. El segundo grupo comprende tales aspectos como purificación y expansión de reordenaciones. El tercer grupo comprende expansión adicional de las reordenaciones en los huevos, junto con la cosecha y la purificación de tales soluciones de virus cosechadas. El cuarto grupo comprende la estabilización de las soluciones de virus cosechadas y pruebas de potencia/esterilidad de las soluciones víricas. Ha de entenderse, sin embargo, que la división de los aspectos de la invención en las anteriores cuatro categorías generales es solamente para fines explicativos/de organización y no debe hacerse interferencia o interdependencia de etapas, etc. De nuevo, se apreciará que otras etapas (tanto similares como diferentes) se usan opcionalmente con los métodos y las composiciones e la invención (por ejemplo, los métodos y las composiciones para las composiciones de vacuna de RTS).

Como se menciona anteriormente, para la facilidad del análisis y la descripción, las diversas etapas de la producción de vacunas puede pensarse como comprendiendo cuatro grupos amplios. El primer grupo comprende tales aspectos como co-infección, reagrupación, selección de reordenaciones y clonación de reordenaciones.

Grupo 1

Los aspectos de la producción de composición de vacunas que se clasifican ampliamente en el presente documento que pertenecen al Grupo 1, comprenden métodos y composiciones relacionadas con la optimización de la co-infección de líneas de cultivo celular, por ejemplo, con un virus donante maestro y uno o más virus de tipo silvestre para producir virus reordenados específicamente deseados; y la clonación de los virus reorganizados seleccionados. La reordenación de las cepas de virus de la gripe se conoce bien por los expertos en la materia. La reordenación tanto de virus de la gripe A como de virus de la gripe B se ha usado tanto en cultivo celular como en huevos para producir cepas de virus reordenados. Véase, por ejemplo, Tannock et al., Preparation and characterisation of attenuated coldadapted influenza A reassortants derived from the A/Leningrad/ 134/17/57 donor strain, Vaccine (2002) 20:2082-2090. La reordenación de las cepas de la gripe también se ha mostrado con construcciones de plásmidos. Véase, por ejemplo, las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 60/375.675 enviada el 26 de abril, 2002, PCT/US03/12728 enviada el 25 de abril, 2003 y las solicitudes de EE.UU. n.º 10/423.828 enviada el 25 de abril, 2003 y PCT/US05/017734 enviada el 20 de mayo, 2005; y el documento US2005018563.

La reordenación, en breve, generalmente comprende mezclar (por ejemplo, en huevos o en cultivo celular) segmentos génicos de diferentes virus. Por ejemplo, 8 segmentos típicos de cepas de virus de la gripe B pueden mezclarse entre, por ejemplo, una cepa tipo silvestre que tenga un epítipo de interés y una cepa "donante", por ejemplo que comprenda una cepa adaptada al frío. La reordenación entre los dos tipos de virus puede producir, entre otros, virus que comprenden la cepa del epítipo de tipo silvestre para un segmento, y la cepa adaptada a frío para otro segmento. Desafortunadamente, para crear las reordenaciones deseadas, a veces es necesario realizar un gran número de reordenaciones. Después de reordenarse, los virus también pueden seleccionarse (por ejemplo, para encontrar los reordenamientos deseados). Los reordenamientos deseados pueden clonarse después (por ejemplo, expandirse en número).

La optimización, selección y clonación tradicionales de los reordenamientos deseados para el virus de la gripe B, normalmente se da por co-infección de cepas del virus en un cultivo celular (por ejemplo, células CEK) seguido de selección con anticuerpos apropiados, por ejemplo, frente a material de uno de los virus parentales (habitualmente realizado en huevos) y la clonación o la expansión del virus, etc. que se realiza normalmente en cultivo celular. Sin embargo, tal reordenación tradicional presenta desventajas en que se necesitan cientos de reordenaciones para crear la mezcla de segmentos deseada. Cuando se realizan tales reordenaciones, es evidente que las reordenaciones realmente aleatorias no son el resultado final. En otras palabras, presiones que predisponen que el proceso exista en los sistemas. Para las cepas de la gripe A, sin embargo, tales procesos no aparecen tener tal predisposición. Para cepas A, la co-infección de cepas (normalmente en cultivo celular tal como células CEK) se sigue de selección y clonación al mismo tiempo, de nuevo, normalmente en cultivo celular.

Optimización de reordenación

Diversas realizaciones que utilizan las etapas del Grupo 1 pueden optimizar el proceso de reordenación para reducir

el número de reordenaciones necesarias (y de esta manera aumentar la salida/estabilidad del proceso de producción de vacunas), etc. Las etapas que utilizan tales técnicas de optimización se realizan normalmente con reordenación de las cepas de gripe B y se realizan normalmente en cultivo celular, por ejemplo, células CEK. Véase, por ejemplo, las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 10/788.236 y PCT/US04/05697 enviadas ambas el 25 de febrero, 2004.

Otros métodos para la reordenación de virus de la gripe puede opcionalmente mezclar diluciones de un virus donante maestro (MDV) y un virus tipo silvestre, por ejemplo, una dilución 1:5 de cada uno sin importar la concentración de las soluciones respectivas, que después se incuban durante 24 y 48 horas a 25 °C y 33 °C. Aunque un enfoque tal es normalmente aceptable para las cepas de gripe A, las cepas de gripe B no dan normalmente resultados positivos con tal protocolo. Por ejemplo, para lograr la reordenación apropiada 6:2 (es decir, 6 genes del MDV y 2 genes, NA y NH del virus tipo silvestre) deben realizarse normalmente cientos de reordenaciones.

Selección y clonación de reordenaciones

Las etapas en el Grupo 1 también comprenden la selección de virus de la gripe reordenados. Las cepas del virus de la gripe A reordenadas son capaces de seleccionarse bien en cultivo celular (por ejemplo células CEK) o bien en huevos. Sin embargo, las cepas de gripe reordenadas presentan problemas cuando se reordenan en cultivo celular (por ejemplo, cuando se seleccionan para células CEK). SE cree que las células CEK interfieren con el gen M de las cepas de gripe B, reduciendo de esta manera el rendimiento global. Diversos métodos de producción de composición de vacunas, véase por ejemplo, las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 10/788.236 y PCT/US04/05697 enviadas ambas el 25 de febrero, 2004, utilizan diferentes etapas para la reordenación de virus, por ejemplo, selección, tales etapas pueden usarse opcionalmente para crear virus para las composiciones de vacuna.

Caracterización de Reordenamientos

Todavía otros métodos de producción de virus/vacunas utilizan aplicaciones de una alta salida de una prueba de electroforesis de polimorfismo de conformación de hebra sencilla/electroforesis capilar (SS/CP/CE) para determinar la constelación génica de los virus de la gripe usados en el presente documento. Los virus de la gripe contienen 8 segmentos génicos y, como se describe anteriormente, la co-infección de una única célula con dos cepas de gripe diferentes puede producir virus reordenados con nuevas constelaciones génicas distintas de cada parental. De esta manera, algunos métodos pueden usar una prueba SSCP/CE para determinar rápidamente la constelación del segmento génico de un gran número de muestras de virus de la gripe. Los segmentos génicos víricos de la gripe se amplifican opcionalmente por RT-PCR usando cebadores marcados fluorescentes específicos para cada uno de los ocho segmentos. Véase también, Irvin et al. (2000) Crin. Micro. J38(2):839-845.

Prevención de contaminación bacteriana

Algunos métodos de la producción de virus/vacunas puede comprender etapas para detectar y/o prevenir/detectar la contaminación microbiana de huevos en los que se produce el virus de la gripe. Las estrategias de detección microbiana de la invención son útiles para detección microbiana rápida/alta y, de esta manera, como muchas otras etapas, son útiles para aumentar el rendimiento y opcionalmente la estabilidad en la producción de virus/vacunas.

Muchas estrategias de producción de vacunas de la gripe actuales, que pueden usarse opcionalmente con la invención en el presente documento, usan como un componente el método tradicional para la expansión del virus de la gripe en huevos de gallina fértiles libres de patógenos específicos. Puede ocurrir una posible contaminación microbiana en varios puntos en la producción del virus en huevos. Desafortunadamente, los huevos de gallina pueden tener algunos microorganismos fuera de sus cáscaras como parte de su flora natural. También es posible tener microorganismos encerrados dentro de la cáscara del huevo durante el desarrollo del embrión de pollo. Los huevos de pollo se incuban a 37 °C en alta humedad para desarrollar el embrión, que constituye condiciones de incubación primarias para muchos tipos de contaminantes microbianos. Otro posible momento de contaminación microbiana ocurre cuando la cáscara se punza para inocular el huevo. Incluso antes de la inoculación del huevo, los huevos normalmente se pulverizan con alcohol, todavía hay oportunidad de que los microorganismos entren al huevo.

Después de la expansión de los virus durante 2 o 3 días en los huevos, la parte de arriba de la cáscara del huevo se retira normalmente para la cosecha manual del fluido alantoico que contiene virus dentro del huevo. Véase, anteriormente. Esta cosecha es otro puto donde puede originarse la contaminación microbiana. Desafortunadamente los huevos con tal carga biológica pueden escapar a la detección, necesitando ponerlo en múltiples botellas para minimizar el rechazo del lote entero debido a un ensayo MPA fallido. Ya que se usan tres cepas de gripe normalmente en la producción de vacunas, se requiere la mezcla de estas tres cepas para el lote final. Se realiza MPA en el proceso (prueba de pureza biológica), por ejemplo, en la cosecha de virus antes del mezclado y la carga para asegurar le producto libre de microbios.

Después de la incubación, el método "tradicional" para velar se usa para identificar huevos infértiles y muertos que estén posiblemente muertos debidos a causas naturales o a contaminación microbiana (es decir, los huevos muertos pueden darse debido a la infectividad del virus y/o la expansión de microorganismos, pero ambas de las cuales requieren detección y retirada de tales huevos). El velado comprende, por ejemplo, el proceso de mantener un

5

huevo en frente de una fuente de luz en una habitación oscurecida para permitir la visualización del embrión en desarrollo. Los huevos muertos se excluyen de la inoculación del virus.

Como puede verse a partir de los puntos anteriores, la detección de contaminación microbiana puede necesitarse en múltiples etapas durante la fabricación de la vacuna de la gripe. Existe una necesidad de eliminar o reducir microbios

10

15

20

Grupo 2

Los aspectos de la producción de virus/vacunas que caen en el Grupo 2 incluyen purificación adicional y expansión del virus, etc. Después del proceso de la reordenación correcta y la clonación de los reordenamientos (es decir, los virus 6:2), tales partículas víricas reordenadas se purifican adicionalmente en huevos de gallina embrionados y los clones correctos se expanden en cantidad (de nuevo a través de crecimiento en huevos de gallinas) para generar una cepa vírica maestra (MSV) o semilla vírica maestra, que, a su vez, se expande adicionalmente para generar una cepa de virus de trabajo maestra (MWVS) o la semilla de virus de trabajo del fabricante. Muchos aspectos de la purificación de partículas de virus a partir de huevos y el uso de tales virus purificados para inocular más huevos para expandir la cantidad de partículas de virus se conocen bien por aquellos expertos en la materia. Muchas tales técnicas son comunes en la producción actual de partículas de virus y se han usado durante al menos 40 años. Véase, por ejemplo, Reimer, et al. Influenza virus purification with the zonal ultracentrifuge, Science 1966, 152:1379-81. Los protocolos de purificación pueden implicar, por ejemplo, ultra-centrifugación en gradientes de sacarosa (por ejemplo, sacarosa al 10-40 %) etc. Además, como se indica en el presente documento, otros procedimientos, etc. listados en otros Grupos también están opcionalmente presentes dentro del grupo 2, por ejemplo, prevención de contaminación microbiana, etc.

25

30

35

Grupo 3

Los aspectos de la producción de virus/vacuna que caen bajo el encabezado el Grupo 3 incluyen, por ejemplo, acondicionamiento de los huevos embrionados (por ejemplo, manejo específico y condiciones ambientales implicadas en la incubación de huevos infectados con virus) y cosechar y clarificar el virus de la gripe del fluido alantoico de los huevos.

40

45

Por ejemplo, acondicionar, lavar, velar e incubar huevos que contienen el virus reordenado para usarse en una vacuna; inocular, sellar, etc. de tales huevos; manejo de tales huevos; cosecha de la solución vírica (por ejemplo, el fluido alantoico o la Cosecha Vírica (VH)) de los huevos; y la clarificación de la solución vírica puede caer dentro de tal categoría. De nuevo, nótese que varias técnicas aplicables a las etapas en el Grupo 2 son igualmente aplicables a las etapas en el Grupo 3 (por ejemplo, velado, etc.). Varios aspectos de la producción de virus/vacunas que comprenden el Grupo 3 se conocen bien por aquellos expertos en la materia. Diversos aspectos de manejo de huevos en la producción de virus, así como la inoculación de huevos con los virus y lavar, incubar, etc. tales huevos se conocen normalmente en la producción de virus/vacunas en huevos. Por supuesto, se apreciará que tales técnicas bien conocidas se usan junto con los únicos e innovadores aspectos de la presente invención. Véase, por ejemplo, las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 10/788.236 y PCT/US04/05697 enviadas ambas el 25 de febrero, 2004, dan etapas adicionales tales como balanceo etc., que pueden usarse también con los métodos y las composiciones de la presente invención. Otras etapas similares pueden incluir filtrado específico y calentamiento de las composiciones, de nuevo, véase lo mismo.

50

55

Filtración y calentamiento

60

La presente invención implica aspectos de ultracentrifugación, véase anteriormente, que pueden caer dentro de la agrupación actual. Además, las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 10/788.236 y PCT/US04/05697 enviadas ambas el 25 de febrero, 2004 también dan otras etapas de filtrado y calentamiento que pueden usarse opcionalmente con los métodos y composiciones de la presente invención. Como se describe, el proceso de fabricación de FluMist™ puede usar huevos de pollo embrionados para generar semillas de virus maestras (MVS),

65

semillas de virus de trabajo del fabricante y cosechas víricas (VH). Las semillas y la cosecha vírica pueden contener carga biológica (normalmente contaminación bacteriana) que podría provocar que los lotes de producto de semillas o de virus se rechazaran en el proceso de producción de vacunas. Por supuesto, se apreciará que el listado específico o la descripción de tipos de productos particulares usados, tamaños, etc., no ha de considerarse limitante en la presente invención salvo que se cite específicamente que sea así.

Grupo 4

El Grupo 4 de los aspectos de la producción de formulación/composición de vacuna comprende, por ejemplo, etapas principalmente referidas a la estabilización (por ejemplo, a través de la adición de componentes, alteraciones en relaciones tampón/NAF, etc.) y los ensayos de potencia/esterilidad soluciones que contienen virus. La descripción de la presente invención anterior, da diversos aspectos que pueden agruparse opcionalmente dentro de la presente categoría. Véase, anteriormente.

En algunas realizaciones, las soluciones/vacunas víricas finales que comprenden virus vivos son estables en una forma líquida durante un periodo de tiempo suficiente para permitir el almacenamiento "en el campo" (por ejemplo, en la venta y la comercialización cuando se refrigera a 4-8 °C, 4 °C, 5 °C, etc.) a través de una estación de vacunación de gripe (por ejemplo, normalmente de aproximadamente septiembre hasta marzo en el hemisferio norte). De esta manera, las composiciones de virus/vacuna se desea que retengan su potencia o que pierdan su potencia a una tasa aceptable durante el periodo de almacenamiento. En otras realizaciones, tales soluciones/vacunas son estables en forma líquida de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 8 °C, por ejemplo, a temperatura de refrigerador. Por ejemplo, si fuera aceptable una pérdida de potencia de 0,3 log y el periodo de almacenamiento fueran 9 meses, entonces sería aceptable una disminución en la potencia de 0,05 log/mes. Como otro ejemplo, si se permitiera una pérdida de hasta 0,75 log, una velocidad de menos de o igual a 0,09 log/mes sería suficiente para permitir la estabilidad de los materiales almacenados continuamente a temperatura del refrigerador (por ejemplo, 4 °C). En otras realizaciones, tales soluciones/vacunas son estables en forma líquida cuando se almacenan de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 8 °C. La estabilidad de la composición puede comprender entre aproximadamente 3 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 4 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 5 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 6 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 7 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 8 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 9 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 10 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 11 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 12 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 13 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 14 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 15 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 16 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 17 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 18 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 19 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 20 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 21 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 22 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 23 meses y aproximadamente 2 años, o más de aproximadamente 2 años.

Uno puede ensayar la estabilidad de una formulación de la invención por un número de métodos. Por ejemplo, uno puede incubar primero una formulación a temperaturas de congelación (por ejemplo, -25 o -70°C (+/- 10, 20, 30, o 40 °C) y después almacenar (o "incubar") la formulación a 4-8 °C durante una longitud de tiempo. La potencia podría medirse por un número de métodos como se describe en el presente documento se conoce de otra manera.

Concentración/diafiltración de cosechas víricas

En algunos métodos de la producción de composición de vacunas, las cosechas de virus se concentran opcionalmente usando una columna apropiada. Véase, las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 10/788.236 y PCT/US04/05697 enviadas ambas el 25 de febrero, 2004.

Estabilizantes/Tampones

La producción de composiciones de vacuna también puede incluir opcionalmente diversas diluciones de NAF (normalmente NAF sin fraccionar) que comprenden el virus de interés y combinaciones de, por ejemplo, sacarosa, arginina, gelatina, EDTA, etc. Véase por ejemplo, las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 10/788.236 y PCT/US04/05697, para ejemplos y diversas combinaciones posibles en diferentes formulaciones de vacuna. Tales métodos y composiciones son preferentemente estables, por ejemplo, no muestran pérdidas inaceptables en potencia, por ejemplo, una pérdida de potencia de menos de 1,0 log, durante los periodos de tiempo seleccionados (normalmente al menos 6 meses, al menos 9 meses, al menos 12 meses, al menos 15 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, etc.) a temperaturas deseadas (por ejemplo, normalmente 4 °C, 5 °C, 8 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 8 °C).

Las formulaciones, o composiciones comprenden un estabilizante que comprende arginina (de pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,2) en combinación con hidrolizado de gelatina) Véase, por ejemplo, las

solicitudes de patente de EE.UU. n.º 10/788.236 y PCT/US04/05697. Además, en muchas soluciones víricas/soluciones vacuna se utiliza opcionalmente una solución base de SPG (sacarosa, fosfato potásico y glutamato monosódico).

- 5 Las solicitudes de patente de EE.UU. n.º 10/788.236 y PCT/US04/05697 enviadas ambas el 25 de febrero, 2004 dan otros métodos adicionales de estabilización de composición de virus/vacuna, por ejemplo, manipulación del nivel de NAF, etc.

Definiciones

- 10 Salvo que se defina lo contrario, todos los términos científicos y técnicos se entienden tener el mismo significado que se usa comúnmente en la técnica a la que pertenecen. Para los fines de la presente invención los siguientes términos se definen a continuación.

- 15 Los términos “ácido nucleico”, “polinucleótido”, “secuencia de polinucleótidos” y “secuencia de ácidos nucleicos” se refiere a polímeros de desoxirribonucleótido o ribonucleótido de cadena sencilla o de doble cadena, o quimeras o análogos de los mismos. Como se usa en el presente documento, el término incluye opcionalmente polímeros de análogos de nucleótidos de origen natural que tienen la naturaleza esencial de los nucleótidos naturales en que se hibridan a ácidos nucleicos de hebra sencilla de forma similar a nucleótidos de origen natural (por ejemplo, ácidos nucleicos peptídicos). Salvo que se indique de otra manera, una secuencia de ácido nucleico particular
- 20 opcionalmente abarca secuencias complementarias, además de la secuencia explícitamente indicada.

- El término “gen” se usa ampliamente para referirse a cualquier ácido nucleico asociado a una función biológica. De esta manera, los genes incluyen secuencias de codificación y/o las secuencias de codificación y/o las secuencias reguladoras requeridas para su expresión. El término “gen” se aplica a una secuencia del genoma específica, así como a un ADNc ARNm codificado por esa secuencia genómica.
- 25

- Los genes también incluyen segmentos de ácido nucleico no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Las secuencias reguladoras no expresadas incluyen “promotores” y
- 30 “potenciadores” para lo que se unen proteínas reguladoras tales como factores de transcripción, resultando en la transcripción de secuencias adyacentes o cercanas. Un promotor “específico de tejido” es uno que regula la transcripción en un tipo de tejido específico o un tipo celular, o ambas.

- El término “vector” se refiere a los medios por los que un ácido nucleico puede propagarse y/o transferirse entre organismos, células o componentes celulares. Los vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos, pro-virus, fagémidos, transposomas, y cromosomas artificiales y similares, que se replican de forma autónoma o pueden integrarse en un cromosoma de una célula hospedadora. Un vector también puede ser un polinucleótido de ARN virgen, que se replica de forma autónoma o puede integrarse en un cromosoma de una célula hospedadora. Un vector también puede ser un polinucleótido de ARN desnudo, un polinucleótido compuesto tanto por ADN como ARN dentro de la misma cepa, un conjugado de poli lisina o de ARN, un péptido conjugado de ADN o ARN, un liposoma conjugado de ARN o ADN, un conjugado de liposoma de ADN, o similares, que no se replican autónomamente pero no necesariamente de forma exclusiva, los vectores del presente documento se refieren a plásmidos.
- 40

- Un “vector de expresión” es un vector, tal como un plásmido que es capaz de promover la expresión, así como la replicación de un ácido nucleico incorporado en el mismo. Típicamente, el ácido nucleico a expresarse está “unido de forma funcional” a un promotor y/o un potenciador, y se somete a control regulatorio por el promotor y/o el potenciador.
- 45

- Un “vector de expresión bi-direccional” se caracteriza por dos promotores alternativos orientados en la dirección opuesta con respecto a un ácido nucleico situado entre los dos promotores, de tal manera que la expresión pueda iniciarse en ambas orientaciones dando como resultado, por ejemplo, la transcripción de ambas hebras positiva (+) o hebra sentido y negativa (-) o antisentido de ARN.
- 50

- En el contexto en el presente documento, el término “aislado” se refiere a un material biológico, tal como un ácido nucleico o una proteína, que está sustancialmente libre de componentes que normalmente acompañan o interactúan con él en su ambiente de origen natural. El material aislado comprende opcionalmente material no encontrado con el material en su ambiente natural, por ejemplo, una célula. Por ejemplo, si el material está en su ambiente natural, tal como una célula, el material se ha colocado en una localización en la célula (por ejemplo, genoma o elemento genético) no nativo para un material encontrado en el medio. Por ejemplo, un ácido nucleico de origen natural (por ejemplo, una secuencia codificante, un promotor, un potenciador, etc.) se vuelve aislado si se introduce por un medio de origen no natural al locus del genoma (por ejemplo, un vector tal como un plásmido o un vector vírico, o un amplicón) no nativo para ese ácido nucleico. Tales ácidos nucleicos también se denominan ácidos nucleicos “heterólogos”.
- 60

- El término “recombinante” indica que el material (por ejemplo, un ácido nucleico o proteína) se ha alterado artificial o sintéticamente (no naturalmente). La alteración puede realizarse en el material dentro, o retirarse de su medio o
- 65

estado natural. Específicamente, cuando se refiere a un virus, por ejemplo, el virus de la gripe, es recombinante cuando se produce por la expresión de un ácido nucleico recombinante.

El término “reordenación”, cuando se refiere a un virus, indica que el virus incluye componentes genéticos y/o polipeptídicos derivados de más de una cepa o fuente vírica parental. Por ejemplo, una reordenación 7:1 indica 7 segmentos genómicos víricos (o segmentos génicos) derivados de un primer virus parental, y un único segmento genómico vírico complementario, por ejemplo, que codifica hemaglutinina o neuraminidasa, a partir de un segundo virus parental. Una reordenación 6:2 incluye 6 segmentos genómicos, más comúnmente los 6 genes internos de un primer virus parental y dos segmentos complementarios, por ejemplo, hemaglutinina y neuraminidasa, de un virus parental diferente.

El término “introducido” cuando se refiere a un ácido nucleico heterólogo o aislado se refiere a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota o procariota donde el ácido nucleico puede incorporarse en el genoma de la célula (por ejemplo, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertido en un replicón autónomo o expresado transitoriamente (por ejemplo, ARNm transfectado). El término incluye tales métodos como “infección”, “transfección”, “transformación” y “transducción”. En el contexto de la invención, puede emplearse diversos métodos para introducir ácidos nucleicos en células procariotas, incluyendo electroporación, precipitación de fosfato cálcico, transfección mediada por lípidos (lipofección), etc.

La frase “célula hospedadora” significa una célula que contiene un ácido nucleico heterólogo, tal como un vector y soporta la replicación y/o la expresión del ácido nucleico. Las células hospedadoras pueden ser células procariotas tales como *E. coli* o células eucariotas tales como células de levadura, de insecto, de anfibio, de ave o de mamífero, incluyendo células humanas. Las células hospedadoras a modo de ejemplo en el contexto de la invención incluyen células Vero (riñón de mono africano verde), células BHK (riñón de hámster bebé), células de riñón de polluelo primario (PKC), células de Riñón Canino de Madin Darby (MDCK), células de riñón bovino de Madin-Darby (MDBK), células 293 (por ejemplo, células 293T) y células COS (por ejemplo, células COS1, COS7).

Virus de la gripe

Las composiciones y los métodos del presente documento se refieren principalmente a la producción de virus de la gripe para vacunas. Los virus de la gripe están hechos de un núcleo de ribonucleoproteína interno que contiene un genoma de ARN de cadena sencilla segmentado y una envuelta de lipoproteína externa revestida por una proteína de matriz. Los virus de la gripe A y de la gripe B contienen cada uno ocho segmentos de ARN de sentido negativo de cadena sencilla. El genoma de la gripe A codifica once polipéptidos. Los segmentos 1-3 codifican tres polipéptidos, haciendo una ARN polimerasa dependiente de ARN. El segmento 1 codifica la proteína del complejo de la polimerasa PB2. El resto de proteínas de la polimerasa PB1 y PA se codifican por el segmento 2 y el segmento 3, respectivamente. Además, el segmento 1 de algunas cepas de gripe codifica una proteína pequeña, PB1-F2, producida a partir de un marco de lectura alternativo dentro de la región que codifica PB1. El segmento 4 codifica la glucoproteína de superficie hemaglutinina (HA) implicada en la fijación celular y la entrada durante la infección. El segmento 5 codifica el polipéptido de la nucleoproteína (NP) de la cápside, el componente estructural principal asociado al ARN vírico. El segmento 6 codifica una glucoproteína de envuelta neuraminidasa (NA). El segmento 7 codifica dos proteínas de la matriz, designadas M1 y M2, que se traducen desde ARNm con corte y empalme diferenciales. El segmento 8 codifica NS1 y NS2, dos proteínas no estructurales que se traducen de variantes alternativamente cortadas y empalmadas de ARNm.

Los ocho segmentos del genoma de la gripe B codifican 11 proteínas. Los tres genes más largos codifican componentes de la ARN polimerasa, PB1, PB2 y PA. El segmento 4 codifica la proteína HA. El segmento 5 codifica NP. El segmento 6 codifica la proteína NA y la proteína NB. Ambas proteínas, NB y NA, se traducen a partir de marcos de lectura que solapan de un ARNm bistrónico. El segmento 7 de la gripe B codifica también dos proteínas: M1 y M2. El segmento más pequeño codifica dos productos, NS1 que se traduce a partir del ARN de longitud completa y NS2 que se traduce a partir de una variante de ARNm de corte y empalme.

Vacuna del virus de la gripe

Históricamente, las vacunas del virus de la gripe se han producido principalmente en huevos de gallina embrionados usando cepas de virus seleccionadas basándose en predicciones empíricas de cepas relevantes. Más recientemente, los virus reordenados se han producido que incorporan antígenos de hemaglutinina y neuraminidasa seleccionados en el contexto de una cepa maestra sensible a temperatura atenuada aprobada. Siguiendo el cultivo del virus a través de múltiples pasajes en huevos de gallina, los virus de la gripe se recuperan y, opcionalmente, se inactivan, por ejemplo usando formaldehído y/o β -propiolactona (o alternativamente usados en vacunas atenuadas vivas).

Sin embargo, la producción de la vacuna de la gripe de esta manera tiene varias preocupaciones importantes. Por ejemplo, los contaminantes que quedan de los huevos de gallina pueden ser altamente antigénicos y/o pirógenos, y pueden resultar frecuentemente en efectos secundarios significativos tras la administración. De esta manera, otro método implica el reemplazamiento de algún porcentaje de los componentes del huevo con medio libre animal. Más

importante, las cepas de virus diseñadas para la producción de vacunas deben seleccionarse y distribuirse, normalmente meses antes de la siguiente estación de gripe para permitir tiempo para la producción y la inactivación de la vacuna de la gripe. De nuevo, cualquier mejora en la estabilidad en el tiempo de almacenamiento y/o el almacenamiento a una temperatura más conveniente (por ejemplo, temperatura de refrigerador de aproximadamente 2-8 °C, por ejemplo, como uso a través de métodos y composiciones de la presente invención), son de esta manera bastante deseables.

Los intentos para producir vacunas recombinantes y reordenadas en cultivo celular se han obstaculizado por la incapacidad de alguna de las cepas aprobadas para la producción de vacunas de crecer eficazmente en condiciones de cultivo celular convencionales. De esta manera, el trabajo anterior por el inventor y sus colaboradores proporcionó un sistema vector y métodos para producir virus recombinantes y reordenados en cultivo, haciendo de esta manera posible producir rápidamente vacunas que corresponden a una o muchas cepas antigénicas seleccionadas de virus. Véase, por ejemplo, las Solicitudes de Patente de EE.UU. n.º 60/375.675 enviada el 26 de abril, 2002, PCT/US03/12728 enviada el 25 de abril, 2003 y USSN 10/423.828 enviada el 25 de abril, 2003 y PCT/US05/017734 enviada el 20 de mayo, 2005. Por supuesto tales reordenamientos se amplifican además opcionalmente en huevos de gallina. Normalmente, los cultivos se mantienen en un sistema, tal como una incubadora de cultivo celular, en humedad y CO₂ controlados, a temperatura constante usando un regulador de temperatura, tal como un termostato para asegurar que la temperatura no excede 35 °C. Tal trabajo pionero, así como la producción de vacunas distintas, puede optimizarse adicionalmente a través del uso de la presente invención completa o en parte.

Los virus de la gripe reordenados pueden obtenerse fácilmente introduciendo un subconjunto de vectores que corresponden a segmentos genómicos de un virus de la gripe maestro, en combinación con segmentos complementarios derivados de cepas de interés (por ejemplo, variantes antigénicas de interés). Normalmente, las cepas maestras se seleccionan basándose en propiedades deseables relevantes para la administración de vacunas. Por ejemplo, para la producción de vacunas, por ejemplo, para la producción de una vacuna atenuada viva, la cepa de virus donante maestro debe seleccionarse para un fenotipo atenuado, adaptación al frío y/o sensibilidad a la temperatura.

FluMist®

Como se ha mencionado previamente, existen numerosos ejemplos y tipos de virus de la gripe. Una vacuna de la gripe a modo de ejemplo es FluMist que es una vacuna viva, atenuada que protege a niños y adultos de la enfermedad de la gripe (Belshe et al. (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children N. Engl. J. Med. 338:1405-12; Nichol et al. (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial JAMA 282:137-44). En realizaciones típicas, los métodos y las composiciones de la presente invención se adaptan preferentemente a, o se usan con, la producción de la vacuna FluMist. Sin embargo se apreciará por aquellos expertos en la materia que las etapas/composiciones en el presente documento también son adaptables a la producción de vacunas víricas similares o incluso diferentes y sus composiciones.

Las cepas de la vacuna FluMist contienen, por ejemplo, segmentos génicos HA y NA derivados de las cepas de tipo silvestre a las que la vacuna se dirige junto con seis segmentos génicos, PB1, PB2, PA, NP, M y NS, a partir de un virus donante maestro común (MDV). El MDV para las cepas de gripe A de FluMist (MDV-A) se creó por el pasaje en serie de la cepa de tipo silvestre A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60) en cultivo de tejido de riñón de pollo primario a temperaturas sucesivamente más bajas (Maassab (1967) Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C Nature 213:612-4). El MDV-A se replica eficazmente a 25 °C (ca, adaptado al frío) pero su crecimiento se restringe a 38 y 39 °C (ts, sensible a temperatura. Adicionalmente, este virus no se replica en los pulmones de hurones infectados (att., atenuación). Este fenotipo ts se cree que contribuye a la atenuación de la vacuna en humanos restringiendo su replicación en todas pero en las regiones más frías del tracto respiratorio. La estabilidad de esta propiedad se ha demostrado en modelos animales y estudios clínicos. Por el contrario al fenotipo ts de las cepas de la gripe creadas por mutagénesis química, la propiedad ts del MDV-A no revierte después del paso a través de hámsteres infectados o en cobertizos aislados de niños (para una revisión reciente, véase Murphy & Coelingh (2002) Principles underlying the development and use of live attenuated cold adapted influenza A and B virus vaccines Viral Immunol. 15:295-323).

Los estudios clínicos en más de 20.000 adultos y niños que implican 12 cepas separadas 6:2 cepas reordenadas han demostrado que estas vacunas están atenuadas, seguras y eficientes (Belshe et al. (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children N. Engl. J. Med. 338:1405-12; Boyce et al. (2000) Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults Vaccine 19:217-26; Edwards et al. (1994) A randomized controlled trial of cold adapted and inactivated vaccines for the prevention of influenza A disease J. Infect. Dis. 169:68-76 ; Nichol et al. (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial JAMA 282:137-44). Los reordenados que llevan a cabo los seis genes internos del MDV-A y los dos segmentos génicos HA y NA de un virus tipo silvestre (es decir, un reordenado 6:2) mantiene consistentemente los fenotipos ca, ts y att (Maassab et al. (1982) Evaluation of a coldrecombinant influenza virus vaccine in ferrets J. Infect. Dis.

146:780-900). La producción de tales virus reordenados que usan cepas B de la gripe enteramente de virus de la gripe B de ADNc clonado y los métodos para la producción de virus de la gripe A y B vivos atenuados son adecuados para formulaciones de vacuna, tales como formulaciones de vacuna vivas útiles para administración intranasal.

Para trabajo reciente, véase, por ejemplo, las Solicitudes de Patente de EE.UU. n.º 60/375.675 enviada el 26 de abril, 2002, PCT/US03/12728 enviada el 25 de abril, 2003 y USSN 10/423.828 enviada el 25 de abril, 2003 y PCT/US05/017734 enviada el 20 de mayo, 2005 han demostrado un sistema de ocho plásmidos para la generación del virus de la gripe B enteramente a partir de ADNc clonado y métodos para la producción de virus de la gripe A y B adecuados para formulaciones de vacuna, tales como formulaciones de vacuna de virus vivos útiles para administración intranasal.

El sistema y los métodos descritos previamente son útiles para la rápida producción en cultivo celular de virus de la gripe A y B recombinantes y reordenados, incluyendo virus adecuados para su uso como vacunas, incluyendo vacunas atenuadas vivas, tales como vacunas adecuadas para administración intranasal tales como FluMist®. Los métodos de la presente invención en el presente documento, se usan opcionalmente junto con o en combinación con tal implicación de trabajo previa, por ejemplo, virus de la gripe reordenados para la producción de vacunas para producir virus para vacunas de una manera más estable, consistente y productiva.

Cultivo celular

Como se ha citado previamente, el virus de la gripe puede crearse opcionalmente en cultivo. Normalmente, la propagación del virus se logra en las composiciones del medio en los que la célula hospedadora se cultiva comúnmente. Las células hospedadoras adecuadas para la replicación del virus de la gripe incluyen, por ejemplo, células Vero, células BHK, células MDCK, células 293 y células COS, células incluyendo 293T, células COS7. Comúnmente, los co-cultivos incluyendo dos de las anteriores líneas celulares, por ejemplo, células MDCK y bien células 293T o bien COS se emplean en una relación por ejemplo de 1:1, para mejorar la eficiencia de replicación. Normalmente, las células se cultivan en un medio de cultivo comercial convencional, tal como medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con suero (por ejemplo, suero bovino fetal al 10 %), o en medio libre de suero, con humedad controlada y concentración de CO₂ adecuada para mantener pH tamponado neutro (por ejemplo, a pH entre 7,0 y 7,2). Opcionalmente, el medio contiene antibióticos para prevenir el crecimiento bacteriano, por ejemplo, penicilina, estreptomycin, etc. y/o nutrientes adicionales, tales como L-glutamina, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, suplementos adicionales para promover características de crecimiento favorables, por ejemplo, tripsina, β-mercaptoetanol y similares.

Los procedimientos para mantener células de mamíferos en cultivo se han informado extensivamente, y se conocen bien por aquellos expertos en la materia. Los protocolos generales se proporcionan, por ejemplo, en Freshney (1983) *Culture of Animal Cells: Manual of Basic Technique*, Alan R. Liss, New York; Paul (1975) *Cell and Tissue Culture*, 5th ed., Livingston, Edinburgh; Adams (1980) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists*, Work and Burdon (eds.) Elsevier, Amsterdam. Los detalles adicionales con respecto a los procedimientos de cultivo celular de interés particular en la producción de virus de la gripe *in vitro* incluyen, por ejemplo, Merten et al. (1996) *Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation* in Cohen and Shafferman (eds.) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines*. Adicionalmente, las variaciones en tales procedimientos adaptados a la presente invención se determinan fácilmente a través de experimentación rutinaria y serán familiares para aquellos expertos en la materia.

En una realización específica de la invención, las células hospedadoras de la invención se cultivan y/o se infectan en condiciones libres de suero, en presencia o ausencia de tripsina, y se cultivan y/o infectan a temperaturas que varían de 30 grados Celsius to 39 grados Celsius; o 30 grados Celsius, o 31 grados Celsius, 32 grados Celsius, 33 grados Celsius, 34 grados Celsius, 35 grados Celsius, 36 grados Celsius, 37 grados Celsius, 38 grados Celsius, o 39 grados Celsius.

Las células para la producción del virus de la gripe pueden cultivarse en medio que contiene suero o medio libre de suero. En algunos casos, por ejemplo, para la preparación de virus purificados, es normalmente deseable crecer las células hospedadoras en condiciones libres de suero. Las células pueden cultivarse a pequeña escala, por ejemplo, menos de 25 ml de medio, en tubos de cultivo o matraces o en grandes matraces con agitación, en botellas rotatorias o en perlas de microvehículo (por ejemplo, perlas de microvehículo DEAE-Dextrano, tales como Dormacell, Pfeiffer & Langen; Superbead, Flow Laboratories; perlas de copolímero de estireno y trimetilamina, tales como Hillex, SoloHill, Ann Arbor) en cultivos en botellas, matraces o reactores. Las perlas de microvehículo son pequeñas esferas (en el intervalo de 100-200 micrómetros de diámetro) que proporcionan una gran área superficial para el crecimiento de células adherentes por volumen de cultivo celular. Por ejemplo un lecho único de medio puede incluir más de 20 millones de perlas de microvehículo proporcionando más de 8000 centímetros cuadrados de superficie de crecimiento. Para la producción comercial de virus, por ejemplo para la producción de vacunas, es normalmente deseable cultivar las células en un biorreactor o un fermentador. Los biorreactores están disponibles en volúmenes de por debajo de 1 litro a un exceso de 100 litros, por ejemplo, Biorreactor Cyto3 (Osmonics, Minnetonka, MN); biorreactores NBS (New Brunswick Scientific, Edison, N.J.); biorreactores a escala de laboratorio y comercial

de B. Braun Biotech International (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania).

Independientemente del volumen del cultivo, en muchos aspectos deseados de la presente invención, es importante que los cultivos se mantengan a una temperatura apropiada, para asegurar la recuperación eficaz del virus de la gripe recombinante y/o reordenado usando sistemas multi plásmidos dependientes de temperatura (véase, por ejemplo, Multi-Plasmid System for the Production of Influenza Virus, citado anteriormente), calentamiento de soluciones víricas para filtración, etc. Normalmente, un regulador, por ejemplo, un termostato, u otro dispositivo para sentir y mantener la temperatura del sistema de cultivo celular y/u otra solución se emplea para asegurar que la temperatura está al nivel correcto durante el periodo apropiado (por ejemplo, replicación del virus, etc.).

En algunos métodos (por ejemplo, en los que los virus reordenados han de producirse a partir de segmentos en vectores) los vectores que comprenden segmentos del genoma de la gripe se introducen en células hospedadoras de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos heterólogos en células eucariotas, incluyendo, por ejemplo, co-precipitación de fosfato cálcico, electroporación, microinyección, lipofección y transfección empleando reactivos de transfección de poliamina. Por ejemplo, los vectores, por ejemplo, plásmidos, pueden transfectarse en células hospedadoras, tales como células COS, células 293T o combinaciones de COS o 293T y células MDCK, usando el reactivo de transfección de poliamina TransIT-LT1 (Mirus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para producir virus reordenados, etc. Aproximadamente 1 µg de cada vector a introducirse en la población de células hospedadoras con aproximadamente 2 µl de TransIT-LT1 diluido en 160 µl de medio, preferentemente medio libre de suero, en un volumen total de 200 µl. Las mezclas de reactivo de transfección de ADN se incuban a temperatura ambiente durante 45 minutos seguido de la adición de 800 µl de medio. La mezcla de transfección se añade a las células hospedadoras y las células se cultivan como se describe anteriormente o a través de otros métodos bien conocidos por aquellos expertos en la materia. En consecuencia, para la producción de virus recombinantes o reorganizados en cultivo celular, los vectores que incorporan cada uno de los 8 segmentos de genoma (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA y NA) se mezclan con aproximadamente 20 µl de TransIT-LT1 y se transfectan en células hospedadoras. Opcionalmente, el medio que contiene suero se reemplaza antes de la transfección con medio libre de suero, por ejemplo, Opta-MEM I y se incuba durante 4-6 horas.

Alternativamente, la electroporación puede emplearse para introducir tales vectores que incorporan segmentos del genoma de la gripe en células hospedadoras. Por ejemplo, los vectores plasmídicos que incorporan un virus de la gripe A o de la gripe B se introducen favorablemente en las células Vero usando electroporación de acuerdo con el siguiente procedimiento. En breve aproximadamente 5×10^6 células Vero, por ejemplo, crecidas en medio de Eagle modificado (MEM) suplementado con Suero bobino fetal (FBS) al 10 % se resuspenden en 0,4 ml de OptiMEM y se coloca en una cubeta de electroporación. Se añaden veinte microgramos de ADN en un volumen de hasta 25 µl, que después se mezcla despacio tapando. La electroporación se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante (por ejemplo, BioRad Gene Pulser II con Capacitance Extender Plus conectado) a 300 voltios, 950 microFaradios con un tiempo constante de entre 28-33 ms. Las células se remezclan agitando suavemente y aproximadamente 1-2 minutos después de la electroporación, se añade directamente a la cubeta 0,7 ml de MEM con FBS al 10 %. Las células se transfieren después a dos pocillos de un cultivo tisular convencional de 6 pocillos que contienen 2 ml MEM, 10 % FBS. La cubeta se lava para recuperar cualquier célula que quede y la suspensión de lavado se divide entre los dos pocillos. El volumen final es aproximadamente 3,5 ml. Las células se incuban después en condiciones permisivas para el crecimiento vírico, por ejemplo a aproximadamente 33 °C para cepas adaptadas al frío. Véase, por ejemplo, el documento US20050158342.

Kits

Para facilitar el uso de los métodos y las composiciones de la invención, cualquiera de los componentes y/o composiciones de vacuna, por ejemplo, virus en diversas formulaciones etc., y componentes adicionales tales como tampón, células, medio de cultivo, útiles para envasar e infectar los virus de la gripe para fines de vacuna experimental o terapéutica, pueden envasarse en forma de un kit. Normalmente el kit contiene, además de los componentes anteriores, materiales adicionales que pueden incluir, por ejemplo, instrucciones para realizar los métodos de la invención, envasado del material y un recipiente.

Ejemplo 1

Desarrollo de FluMist líquido

Un total de 19 lotes monovalentes de virus se iniciaron bajo protocolo, incluyendo cuatro lotes de desarrollo (CB0006H, CB0008H, CG0017H, CB0018H y CB0019H). Los lotes CB0018H y CB0019H se dirigieron a suministrar material para diversos estudios y no se analizan adicionalmente en la presente solicitud. Dos lotes (CB00180H y CB0012H) se combinaron después de la etapa de ultra-centrífuga para producir un lote monovalente A/Sidney CB0020H. Cada lote se inició con aproximadamente 2000 huevos.

Las condiciones de manejo de incubación de los huevos se establecieron similares al proceso usado para la producción de FluMist congelado, sin embargo, la inoculación manual y la cosecha se usaron debido a la escala más pequeña, etc. El proceso de ultracentrífuga se escaló a un equipo más pequeño fabricado por el mismo fabricante

(Discorvery 90, fabricado por Hitachi y comercializado por Sorvall/heraus) con un rotor modelo P32CT que tiene aproximadamente 470 ml de capacidad total. La cosecha de virus estabilizada clarificada se cargó sobre un gradiente de sacarosa del 20 % al 60 %, se bandeó durante una hora a 32.000 rpm y eluyó en fracciones de 20 ml. Las fracciones que contenían niveles pico de HA se hicieron conjunto, se diluyeron a una concentración de sacarosa de 0,2 M, se filtraron a través de un filtro de 0,2 micrómetros y después se transfirió a bolsas de polímero flexibles de 250 ml (Stedim) que se congelaron y se mantuvieron por debajo de -60 °C para fabricación adicional.

Después de una corta serie de ejecuciones de ensayo, se inició la fabricación de cGMP para soportar el ensayo clínico adicional de FluMist líquido. Se fabricaron de nuevo A/Beijing/262/95 (H1N1) y A/Sídney/05/97 (H3N2) y la cepa B se cambió a B/Yamanashi/166/98. Los lotes monovalentes producidos se congelaron y se enviaron para mezclar, cargar y envasar. Por supuesto, se apreciará en este punto y a lo largo de todo, que el uso de cepas particulares (por ejemplo, Beijing, etc.) no debe tomarse necesariamente como limitante salvo que se indique específicamente que lo sea. De esta manera, por ejemplo, los métodos y formulaciones en el presente documento pueden usar opcionalmente diferentes cepas cada estación de gripe para producir diferentes composiciones de RTS, etc.

Desarrollo y Ensayos clínicos

El proceso para las composiciones líquidas se desarrolló e incluyó lotes monovalentes CAZ001-024 y CAZ035-043. La materia clínica de ensayo (CTM) incluyó lotes monovalentes de CAZ025-CAZ034.

El proceso de fabricación de FluMist líquido desarrollado y usado para CTM-1 se divide en seis fases de proceso a continuación. Las fases de proceso 1 a 5 se definieron para conectar las etapas mayores de proceso ya que se llevaron a cabo usando documentos de instrucción de fabricación separados. La fase 6 incluye la mezcla el proceso entero de mezcla y carga. Se apreciará que tales fases pueden compararse a groso modo en con las etapas generalizadas indicadas a continuación para la fabricación/producción de composiciones de vacuna en general.

Fases

Fase 1: recepción y saneado de los huevos SPF; Fase 2: producción de cosecha de virus; Fase 3: concentración de virus por centrifugación zonal; Fase 4: agrupación y dilución de fracciones pico; Fase 5: filtración estéril y almacenamiento de lote monovalente; y Fase 6: mezcla y carga

Un diagrama de flujo de proceso para la producción de lote monovalente de CTM-1 se muestra en la Figura 1. El flujo de proceso de mezcla y carga se muestra en la Figura 2.

Recepción y saneado de huevos SPF

Se obtuvieron huevos embrionados libres de patógenos específicos (SPF) se obtuvieron de SPAFAS, Inc. que utiliza el manejo de floculación programas de supervivencia diseñados para proporcionar aseguración adecuada de huevos libres de enfermedades. Los huevos se usaron en los Estados Unidos y se sanearon usando pulverizadores Clorwash y Quat 800. Los huevos se transportaron después por aire y carretera usando envase suficiente para mantener limpieza y evitar el congelamiento o el sobrecalentamiento. Tras la recepción, los huevos fértiles fríos se inspeccionaron y se almacenaron en una unidad de incubación SPF a 14 °C +/- 2 °C con un 60-80 % de humedad relativa (HR) durante un máximo de 7 días. Los huevos se transfirieron a bandejas dese los cartones suministrados por el vendedor y un número de lote asignado. Los huevos se colocaron en bandejas Jamesway de 36 huevos y las superficies de la cáscara de huevo se sanearon con Clorwash y Quat 800 en un sistema de saneado de huevos automatizados para minimizar la carga biológica antes de colocarlos en la incubadora. Se preparó clorwash a un intervalo de 43-44 °C y 48-49 °C y se preparó Quat 800 a un intervalo de 48-49 °C y se preparó Quat 800 a un intervalo de 48-49 °C. Después del saneamiento, los huevos se colocaron en maletas y se secaron al aire a temperatura ambiente durante no menos de 2 horas. Los huevos se colocaron después en una Incubadora Buckeye y se incubaron a 37,5 °C +/- 1 °C con un 60-80 % de HR durante 264 horas +/- 12 horas. Después de la incubación, los huevos SPF se transfirieron desde la unidad de huevos SPF a un área de velado. Usando una lámpara de fibra óptica, la posición del saco de aire se localizó en cada huevo. Los huevos muertos o infértiles se descartaron, y los huevos fértiles se marcaron para inoculación.

Producción de cosechas víricas

La superficie de los huevos fértiles se saneó con espíritus metilados industriales (IMS) al 70 % antes de la inoculación y después se transfirió para inoculación de masa. En la preparación de la semilla vírica de trabajo del fabricante (MWVS), las semillas víricas maestras se usaron para producir la MWVS para las pruebas clínicas de fase 1 se produjeron usando el método de reordenación clásico. El MWVS se transfirió en el AVU y se prepararon diluciones en serie del MWVS descongelado en solución salina tamponada con fosfato 0,01 M estéril, pH 7,7 dentro de una cabina de seguridad microbiológica usando una pipeta desechable estéril para cada transferencia. La inoculación ocurrió en flujo laminar en una habitación de clase 10.000 usando una máquina de inoculación Bibby semi-automática, que penetra e inocula 36 huevos por bandeja. El título diana para el inóculo fue log₁₀ 2,1 TCID₅₀

por 0,1 ml y la dilución se calculó a partir de la titulación predeterminada de MWVS. La preparación de cada inóculo de virus se completó en 2 horas de la retirada del vial del congelador. Las alícuotas del inóculo se almacenaron a 5 +/- 3 °C hasta el uso. El inóculo se usó en 8 horas de la preparación.

5 Inoculación de huevos SPF

Cada bandeja de huevos se suministró a mano en la máquina de inoculación Bibby automatizada. Se usó un punzón para perforar la cáscara y penetrar en el huevo a una profundidad ajustable preestablecida. Las agujas de inoculación se extendieron hacia el huevo y la bomba de dosificación envió 0,1 ml del inóculo de MWVS en cada huevo después de lo que se extrajo el punzón. Siguiendo la inoculación, la bandeja de huevos se retiró por un operador y el proceso se repitió con una nueva bandeja de huevos. Los huevos inoculados con CAIV se incubaron a 33 +/- 1 °C durante un tiempo determinado por la curva de crecimiento de la cepa de virus. Después de la incubación, los huevos embrionados SPF se enfriaron a 28 °C durante 18 +/- 6 horas. Al final del enfriado, los huevos se transfirieron para la etapa de cosecha.

Concentración de virus por centrifugación zonal

Cosecha de virus (VH)

Los huevos se cosecharon con una máquina de cosecha automática (Bibby). Las bandejas se suministraron a mano a una estación de decapitación donde la sección superior de la cáscara de huevo se retiró para crear un agujero de acceso para la entrada de la aguja de cosecha. Los huevos se inspeccionaron visualmente antes de la cosecha y los huevos inadecuados (por ejemplo, descolorados) se rechazaron. Los huevos aceptables avanzaron a una solución de cosecha, donde se extrajo fluido alantoico usando agujas y succión proporcionada por un sistema de vacío. La cosecha se recogió mezclada en un recipiente de acero inoxidable con camisa de 100 l con una temperatura de camisa de 2-8 °C. Las muestras de los virus cosechadas se recogieron del conjunto VH y se ensayaron para: potencia (TCID₅₀), seguridad, leucosis aviar, *M. tuberculosis*, micoplasma, virus extraño, identidad, ensayo de la transcriptasa reversa, genotipo del virus, fenotipo del virus y atenuación.

Estabilización y clarificación

La cosecha de virus conjunta (VH) se estabilizó inmediatamente a 2-8 °C a una concentración final de sacarosa 0,2 M, fosfato 0,01 M, glutamato 0,005 M (SPG), con SPG 10X (9 partes VH por 1 parte SPG 10X). Las muestras se recogieron para potencia y carga biológica antes de la clarificación. La cosecha de virus estabilizada se clarificó por una filtración de profundidad 5 µm para retirar partículas antes de la purificación por centrifugación de flujo continuo de alta velocidad. La cosecha de virus clarificada se muestreó para la potencia.

Centrifugación zonal, recogida y ensayo HA de fracciones pico

Antes de su uso, el rotor de centrifuga se saneó con una dilución 1:20 de solución de formaldehído concentrada. El VH clarificado se cargó sobre un gradiente de sacarosa (sacarosa al 10-60 % en tampón fosfato, pH 7,2) para centrifugación continua de alta velocidad usando una centrifuga zonal Hitachi CP40Y. El gradiente se formó por adición a la centrifuga de una solución de sacarosa al 60 % seguido de una solución de sacarosa al 10 % en tampón fosfato. La velocidad de la centrifuga se ajustó a 4.000 rpm durante 20 minutos para permitir que las soluciones de sacarosa formen un gradiente de densidad. La temperatura de la centrifuga se ajustó a 2-8 °C durante la formación del gradiente. Después de la formación del gradiente, se inició el flujo de tampón y la velocidad del rotor se aumentó a 40.000 rpm, antes de que la VH clarificada se cargara sobre el gradiente a una velocidad de 20 l por hora a 40.000 rpm. Para un lote típico de CTM-1 con 10.000 huevos cosechados y 6 ml/huevo, la duración de la etapa de carga fue aproximadamente tres horas. Siguiendo la carga de la VH clarificada, la centrifugación se continuó a 40.000 rpm durante una hora adicional para permitir al virus bandear. Las partículas del virus migraron a la porción de sacarosa del 38-45 % del gradiente y se concentró en una "banda". Al final de esta etapa, la centrifuga se ralentizó gradualmente y después se paró para permitir la colección de los picos de virus. Se recogieron 100 ml de fracciones en flujo laminar en 125 ml de botellas de policarbonato estériles. Las fracciones se mantuvieron a 2-8 °C durante aproximadamente 1 hora mientras que las fracciones se ensayaron para actividad HA. Las fracciones pico se encontraron normalmente entre 38-45 % del gradiente de sacarosa.

Conjunto y dilución de fracciones pico

Las fracciones pico de centrifuga, como se identifica por el ensayo HA, se juntaron bajo una capucha de flujo laminar vertiendo asépticamente las fracciones en una botella de vidrio estéril y se mezcla por remolino. El índice refractario (RI) se leyó para determinar la concentración de sacarosa y el conjunto se muestreó para la potencia. El conjunto de fracción pico de centrifuga (CP) se diluyó añadiendo asépticamente un volumen calculado de tampón fosfato-glutamato (2-8 °C) frío estéril, pH 7,2 (tampón PBG) a una concentración final de 0,2 M de sacarosa, 0,1 M de fosfato y 0,005 M de glutamato. Esto fue normalmente una dilución 1:6. El conjunto de fracción pico de centrifuga diluido (DCP) se muestreó para potencia y carga biológica.

Filtración estéril y almacenaje de lote monovalente

El DCP se bombeó a través del tubo estéril a una habitación de carga de Clase 100 para la filtración estéril. El DCP se filtró estéril con un filtro de 0,22 μm en una botella de vidrio estéril de 5 l en una capucha de flujo de aire laminar. El lote monovalente filtrado se mezcló y se muestreó para potencia, identidad y ensayo de esterilidad. El filtro de 0,22 μm se ensayó para integridad antes y después del proceso de filtración. El MB se alicuotó después en botellas de policarbonato de un lecho. El MB se recogió en alícuotas de 500 ml con un volumen total de tres a cuatro litros. Las botellas estériles de un lecho de PC se almacenaron a $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ o por debajo. El título de los virus de lote se determinó por ensayo TCID_{50} . El lote monovalente después se envió a $<-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para mezclar y ensayar.

Mezcla y carga

Las etapas principales para el proceso de mezcla y carga de la preparación de la mezcla trivalente fueron: Descongelado, preparación del diluyente, mezcla, carga y envasado.

Descongelación y mezcla

La 1 botella apropiada de lote monovalente se retiró del almacenamiento congelado ($<60\text{ }^{\circ}\text{C}$ para MB) y se transfirió a una habitación de descongelado. Las cantidades requeridas de los tres lotes monovalentes individuales y el diluyente SPG se calcularon basándose en la titulación de infectividad y la resistencia a la formulación requerida. Las botellas de MB se cargaron en un baño de agua de $33 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se agitó manualmente cada cinco minutos. El descongelado se monitorizó visualmente para asegurar que todas las botellas se habían descongelado antes de dejar el baño de agua y que todas las botellas descongeladas se retiraron cada 15 minutos. Una vez descongeladas, las botellas de MB se movieron a un refrigerador a $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ y se mantuvo hasta que todas las botellas requeridas se habían descongelado.

El diluyente glutamato fosfato de sacarosa estéril (SPG) se fabricó por BioWhittaker (Walkersville, MD). Justo antes de la fabricación del líquido FluMist mezclado, aproximadamente un tercio de la cantidad de diluyente SPG requerida para la mezcla se añadió a una botella de 2 l estéril. La botella se calentó a temperatura ambiente, después se añadió gelatina de porcino hidrolizada (polvo) en la cantidad necesaria para alcanzar un nivel de 10 mg/ml en la mezcla final. El diluyente SPG se pasó después a través del filtro (lavando a través de cualquier gelatina residual) para alcanzar el volumen diana especificado en el cálculo de la mezcla y almacenado a $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el uso.

Las botellas descongeladas se movieron a una habitación de mezcla y se transfirieron asépticamente los virus a un recipiente de proceso de vidrio de 5 l. El recipiente se mantuvo a $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ a través de todo el proceso de mezcla y el posterior proceso de carga usando envases fríos refrigerados. El diluyente SPG-gelatina se añadió después de que se hubieran añadido las tres cepas de virus y, si fuera necesario, el pH se ajustó con HCl a $7,2 \pm 0,3$. Las tres cepas de virus y el diluyente se mezclaron por mezcla continua con una barra de agitación magnética y una placa de agitación.

Carga y envasado

Siguiendo al ajuste de pH, el recipiente de mezcla de reacción trivalente en lote se movió a una habitación de carga y se conectó a un cargador INOVA. La máquina de carga INOVA cargó un volumen preajustado de volumen de producto en una fila de ocho pulverizadores desechables BD HYPAK y después se taparon los pulverizadores. Las funciones de carga y tapado de los pulverizadores y las comprobaciones de verificación del peso continuaron como se dirigió. Un nuevo tubo de pulverizadores se colocó manualmente en las estaciones de suministro tras completarse cada ciclo de carga y el tubo de los pulverizadores cargados se retiró a la estación de descarga. El recipiente de mezcla se mantuvo a $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$ con envases fríos durante el proceso de carga.

Siguiendo la carga de los pulverizadores nasales, las vacunas trivalentes cargadas se cargaron en tubos e inmediatamente se transportaron a través de un carro a un área de envasado para el empaquetado y el etiquetado finales. Los pulverizadores empaquetados y etiquetados se almacenaron a $5 \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$.

*Optimización de parámetros de funcionamiento aguas arriba*Clarificación de cosecha por filtración (5 μm)

Filtración frente a centrifugación a baja velocidad: las pérdidas de potencia de clarificación usando la centrifugación a baja velocidad convencional para FluMist congelado se estiman normalmente a 0,2 a 0,3 $\log_{10}$ $\text{TCID}_{50}/\text{ml}$. Una pérdida de centrifugación estimada para dos cepas fue: la pérdida de titulación fue despreciable para una cepa y 0,3 logs (59 % de etapa de rendimiento) para una segunda cepa usando las condiciones convencionales de 3400 g durante 20 minutos. Cuando se usó un filtro de profundidad de 5 micrómetros se usó como una alternativa a la centrifugación durante las ejecuciones de desarrollo pre-CTM, el rendimiento se estimó al 41 %. Cuando el ensayo de variabilidad TCID_{50} se tomó en consideración, se concluyó que bien el método de clarificación proporcionó mejores resultados que añadirlos después de la clarificación. La filtración se eligió como el método de clarificación

basado en la facilidad de operación y escalabilidad.

Comparación de tamaños de poro del filtro de profundidad: Los lotes de desarrollo CAZ015 – CAZ017 más los lotes CTM-1 CAZ025 a CAZ034 se usaron para estimar las pérdidas de filtración de profundidad usando el proceso CTM-1. A/Beijing, A/Sídney y B/Harbin tienen rendimientos de etapa del 147 %, 78 % y 73 % respectivamente para la etapa de clarificación de 5 µm.

El filtro de 5 µm (Pall PRofile II) se comparó con un filtro de profundidad de 20 µm (Pall Profile Star), que se usó para los lotes CAZ035 (A/Sídney), CAZ036 (A/Beijing) y CAZ037 (B/Harbin). A/Beijing, A/Sídney y B/Harbin tuvieron rendimientos de etapa de clarificación del 65 %, 35 % y 209 % respectivamente para la etapa de clarificación de 20 µm. Estos rendimientos fueron comparables a los resultados de clarificación de 5 µm, sin embargo, un cambio en el proceso del filtro de 20 µm no se recomendó para todas las realizaciones debido a la contaminación significativa de las cosechas clarificadas por las células sanguíneas rojas cuando se usó un tamaño de poro más grande.

Optimización de parámetros de funcionamiento aguas abajo:

Escala de centrifuga

La carga de centrifuga y los estudios de temperatura se realizaron usando la centrifuga CP40Y a gran escala y un rotor de flujo continuo RP40CT tipo D; estos compararon diversos tamaños de lotes de huevo y los puntos de ajuste de temperaturas (véase la Figura 3). CAZ015 (B/Harbin), CAZ018 (A/Sídney), CAZ020 (A/Beijing) y CAZ022 (A/Sídney) tuvo tamaños de lote de 10K huevos y una temperatura de ajuste de centrifuga de 4 °C. CAZ 016 (B/Harbin), CAZ019 (A/Sídney), y CAZ021 (A/Beijing) tuvieron tamaños de lote de 20K huevos y una temperatura de ajuste de centrifuga de 14 °C. Se usó una tasa de flujo de carga de 20 l/h para todos los estudios. El porcentaje de recuperación en el conjunto de fracción pico diluida (rendimiento de etapa) se basó en el título de cosecha clarificado en la figura. Como puede verse, los lotes con lotes de 10k huevos tuvieron un intervalo de recuperación de 40 – 184 % mientras que los lotes de 20K huevos tuvieron recuperaciones promedias de 46 %. Un tamaño de lote de 10.000 huevos por funcionamiento se seleccionó para la fabricación de CTM como límite conservador en una etapa del proceso de desarrollo.

Temperatura

El desarrollo de las ejecuciones CAZ015 a CAZ022 se realizaron usando temperaturas de punto de ajuste de rotor de ultracentrifuga de bien 4 °C o 14 °C. Con una excepción, el desarrollo funciona a 14 °C también funcionaron a escala más grande que al típica (20.000 huevos por lote). En general los lotes tuvieron menores recuperaciones del virus vivo, sin embargo esto podría deberse a carga de centrifuga en lugar de los efectos de temperatura. En vista de los mejores resultados a 4 °C y la posibilidad de tasas de crecimiento microbiano aumentado a mayores temperaturas, se seleccionó una temperatura de 4 °C como el punto de ajuste de la temperatura de ultracentrifuga en este punto en el desarrollo del proceso.

Prueba clínica 1 (CTM-1)

Los lotes de virus monovalente para CTM-1 se produjeron y se incluyeron lotes monovalentes de CAZ025 a CAZ034. El ensayo en el proceso QC para los lotes monovalentes CTM-1 se presentan en la Figura 3 y en el presente documento. Los rendimientos de etapa promedio por cepa se presentan en la Figura 3 y en el presente documento. Los resultados se resumen a continuación.

Potencia: Las potencias ($\log_{10}$ TCID₅₀/ml) de los virus B/Harbin y A/Beijing de los lotes de cosecha fueron iguales o mayores de 8,1. A/Sídney varió de 7,5 a 8,8 excepto para CAZ030, que mostró un título muy bajo (6,0) debido a la contaminación de la yema en la cosecha. La titulación del lote monovalente para A/Beijing fue 9,3 o superior, para B/Harbin el título varió de 8,4 a 9,85 y para A/Sídney varió de 7,9 a 8,6 (excluyendo CAZ030). Para CAZ030 el título estuvo por debajo del nivel aceptable para mezclar como se analiza a continuación.

Rendimiento del proceso: los rendimientos de proceso para cada lote se hacen referencia en las Figuras y se analizan además en el presente documento. Los rendimientos del proceso no se corrigieron para pérdidas de muestra. A/Beijing tuvo un rendimiento de proceso global promedio del 16 % (163 dosis/huevo), A/Sídney tuvo un rendimiento promedio del 13 % (6 dosis/huevo) y B/Harbin tuvo un rendimiento promedio del 93 % (86 dosis/huevo). Véase las figuras. El rendimiento errático estima una variabilidad de ensayo de reflejo así como el rendimiento de proceso real. En particular, los resultados de B/Harbin fueron hacia arriba por un estimado muy alto de lote CAZ028 de titulación de lote monovalente (resultando en un rendimiento de proceso estimado del 252 % y 246 dosis/huevo). La titulación pico de conjunto diluida en este caso se determinó a 0,95 logaritmos mayor que el pico de centrifuga conjunto, aunque se esperaría una disminución debido a la dilución. Igualmente la titulación del lote monovalente filtrado fue mayor que el material prefiltrado, que puede contar para la variabilidad de ensayo. Los otros dos lotes de B/Harbin (CAZ026 y CAZ027) tuvieron rendimientos de proceso del 20 % y el 8 % respectivamente y un rendimiento de huevo de 7 dosis/huevo para ambos lotes. Las mezclas trivalentes que incluyeron el lote CAZ028 (CBF1004 y CBF1007) resultaron en potencias B/Harbin en pulverizadores de producto final que fueron 0,6 y 0,4 $\log_{10}$ TCID₅₀

por dosis. Esto sugiere además que la titulación del lote monovalente CAZ028 se sobreestimó.

Carga biológica y endotoxina: la cosecha vírica, la cosecha estabilizada y las fracciones pico de centrifuga diluidas se ensayaron para la carga biológica. Los resultados de ensayo de la carga biológica no dan una imagen clara de cargas de organismo a través del proceso: los resultados de ensayo en la cosecha vírica y las muestras de las fracciones pico de centrifuga diluidas consistían principalmente en “ninguno detectado” (ocho lecturas); o “>100 ufc/ml” (diez lecturas) con solamente dos valores intermedios. Los valores de endotoxinas para los lotes monovalentes variaron de <5 EU/ml a 587 EU/ml.

Concentración de sacarosa. Las fracciones pico de centrifuga diluidas tenían concentraciones de sacarosa que varían del 39 al 43,5 % (CAZ030 no se incluyó en el intervalo). Los lotes monovalentes tenían una concentración de sacarosa promedio del 7,6 %.

Los resultados de la prueba de liberación de lote monovalente se presentan en las figuras. Todos los lotes CTM-1 excepto CAZ030 (que no se ensayó) pasaron los ensayos de liberación de lote.

Análisis SDS-PAGE: los lotes monovalentes se caracterizaron además por geles SDS-PAGE al 10 % con Gel Code Blue. Basado en los pesos moleculares proteicos calculados y el número de copias por partícula para las cepas de gripe A y B, las bandas de gel en la región de 50-60 kDa (proteína HA1), 56 kDa (proteína NP) y 27 kDa (proteína M1) se esperaba ser geles prominentes del virus de la gripe purificados. También podría estar presente la proteína Ha2 (23 a 30 kDa).

Se compararon los geles SDS-PAGE para A/Beijing/262/95 CAZ031, y 33 y A/Sídney/05/97 CAZ029, 30, y 34. El intervalo de resolución para los geles al 10 % fue nominalmente 200-31 kDa. Debido a esta limitación, la interpretación de las bandas de la proteína HA1 (23-30 kDa) y de proteína M (21-27 kDa) debe realizarse con precaución.

Para los lotes monovalentes (MB) A/Beijing y A/Sídney, se observó una banda oscura en la región esperada de la proteína NP (justo por encima del marcador de 55 kDa) para las muestras de A/Beijing, y se vio justo por encima una banda de 116 kDa para ambas cepas. Ambas cepas contenían una banda cerca del frente del gel (por debajo de 31 kDa) coherente con la proteína M. La banda HA1 esperada en o justo por encima del marcador de 66 kDa fue menos fuerte, posiblemente debido a la heterogeneidad en el peso molecular de glucoproteína resultando en un patrón de bandas más dispersado. La tinción de la proteína NP1 putativa también parece disminuirse. Ara las muestras de A/Sídney se observó una variedad de bandas mayor, consistente con una mayor proporción de proteína de huevo en el lote monovalente.

Dosis por lote y huevo: el cálculo de dosis para las tres cepas se basó en un volumen de carga promedio de 0,24 ml que contiene $1,2 \times 10^7$ TCID₅₀ partículas. Basándose en los cálculos anteriores, los lotes monovalentes A/Beijing tuvieron un promedio de 1.576.022 dosis totales por lote. Las dosis totales promedio por lote para B/Harbin y A/Sídney fueron 601.446 y 50825 dosis por lote respectivamente, o un 38 % y un 3,2 % de la media de dosis totales de A/Beijing por lote respectivamente. Estos resultados se traducen en los siguientes valores para dosis monovalentes por huevo: 163 dosis/huevo para 86 dosis/huevo para tipo B/Harbin y 6 dosis/huevo para A/Sídney. El cálculo para las dosis/huevo se basó en el número total de huevos recolectados para fabricar el lote.

Resumen de los rendimientos de huevos: A/Sídney tuvo el volumen de cosecha promedio más alto por rendimiento de huevo, seguido de A/Beijing y B/Harbin. El rendimiento por huevo promedió 5,6 ml/huevo para B/Harbin, 6,5 ml/huevo para A/Beijing y 6,8 ml/hubo para A/Sídney. El rendimiento global de los huevos viables para la producción promedió un 82 %. Los rendimientos de huevos se basaron en el número total de huevos cosechados en comparación con el número total de huevos para la producción. El porcentaje de huevos rechazados pre-inoculación promedió un 10 %. El porcentaje de rechazo post-incubación promedió un 5 %, con la excepción de CAZ028, que tuvo una tasa de rechazo del 29 %.

Resumen de rendimiento de purificación (TCID₅₀): los valores de potencia de cosecha clarificada fueron mayores que el material de partida para alguno de los lotes, resultando en etapas de rendimiento mayores del 100 %. Los estimados de rendimiento de etapa se afectan por la variabilidad del ensayo TCID₅₀, que tuvo una desviación estándar por encima de $0,3 \log_{10}$ TCID₅₀/ml como se realiza en el tiempo de producir las funciones. Además, el rendimiento de la etapa en el Conjunto de fracción de pack de centrifuga diluida varía ampliamente para las tres cepas y es mayor del 100 % para todos los diez lotes CTM. Esto parece ser debido a una tendencia sistemática de las titulaciones para los conjuntos de fracción pico de centrifuga (como se sugiere por el rendimiento >100 de la siguiente etapa), se cree que está relacionado con los altos niveles de sacarosa en estas muestras.

Comentarios de los lotes CTM-1

En las diversas realizaciones y el ejemplo en el presente documento es preferible que no tenga lugar contaminación de la yema de los fluidos de cosecha que podrían ocurrir, por ejemplo con ajustes de la máquina de cosecha impropios.

Etapa de filtración de 0,2 micrómetros: el récord del lote en efecto especificó un filtro desechable Pall Kleenpak, sin embargo no se usó para ningún lote CTM. Los lotes CAZ025 – 030 usaron un filtro de cartucho (AB1DFL7PH4 – Filtro Pall hidrófilo PVDF Fluorodina II) con alojamiento en lugar del Kleenpak. Los filtros tenían materiales de construcción similares (PVDF hidrófilo), sin embargo, las áreas de filtro fueron 5100 cm² para el cartucho Fluorodina II frente a 1500 cm² para el filtro Kleenpak Fluorodina II. Para los lotes CAZ031/032/033/034 se usó un ensamblaje de filtro Pall NovaSip C3DFLP1 desechable en lugar del Kleenpak. El área superficial de membrana para el filtro C3DFLP1 fue el mismo que el filtro Kleenpak (1500 cm²).

Excursiones de temperatura: Durante la segunda etapa de incubación para CAZ031, la temperatura se elevó a 34,4 °C durante 13 horas y para CAZ032 la temperatura cayó a 31,5 °C durante 4 horas. Estos lotes alcanzaron titulaciones de cosecha normales por encima de 9,0 log₁₀ TCID₅₀/ml, por lo que las excursiones no importaron como habiendo impactado al producto.

Sumario

Basado en dos Campañas de Fabricación de prueba clínica (CTM-1 y CTM-2), el desarrollo del proceso FluMist líquido y el trabajo de fabricación indica que el proceso es adecuado para producir suministros clínicos que pasan las especificaciones de liberación. Los datos agregados de ambas ejecuciones de CTM y diversos estudios e desarrollo dan lugar a los siguientes estimados del rendimiento de proceso promedio:

Clarificación: rendimiento del 50 %
Purificación de ultracentrífuga: rendimiento del 50 %
Dilución pico y filtración estéril: 20 al 50 % de rendimiento

Ejemplo 2 ensayo de estabilidad

Se preparó una formulación de vacuna trivalente que comprende tres virus de la gripe reorganizados diferentes (7,0 +/- 0,5 log₁₀ FFU/dosis [aproximadamente 7,0 +/- 0,5 log₁₀ TCID₅₀/dosis]) y que comprende sacarosa 200 mM; hidrolizado de gelatina porcina al 1 % (p/v); monoclóhidrato de arginina al 1,21 % (p/v) [equivalente a base de arginina al 1 % (p/v)]; y glutamato monosódico 5 mM en tampón fosfato potásico 100 mM, (pH 7,2). La estabilidad de la formulación se almacenó a -25 grados C +/- 5,0 grados para más que o igual a 24 horas, pero menos de o igual a dos horas y después almacenado a 2-8 grados C durante diversos periodos de tiempo. Esta formulación (por ejemplo, lote 0141500003) se determinó ser estable durante al menos 12 semanas a 4-8 grados C. En particular, la potencia para cada cepa de virus se mantuvo dentro de 0,5 log₁₀ del principio de la potencia antes del almacenaje a 4-8 grados C.

Otros estudios han demostrado que las formulaciones equivalentes (que comprenden tres virus de la gripe reorganizados diferentes) (7,0 +/- 0,5 log₁₀ FFU/dosis [aproximadamente 7,0 +/- 0,5 log₁₀ TCID₅₀/dosis]) y que comprende sacarosa 200 mM; hidrolizado de gelatina porcina al 1 % (p/v); monoclóhidrato de arginina al 1,21 % (p/v) [equivalente a base de arginina al 1 % (p/v)]; y glutamato monosódico 5 mM en tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7,2) de diferentes lotes clínicos (por ejemplo, "Campaña 3" son estables durante aproximadamente 12-25 meses a 5,0 (+/- 3,0) grados C.

Los estudios posteriores han demostrado que las formulaciones que comprenden solamente sacarosa 200 mM; hidrolizado de gelatina al 1 % (p/v); monoclóhidrato de arginina al 1,21 % (p/v) [equivalente a base de arginina al 1 % (p/v)] en tampón fosfato potásico 100 mM, pH 7,2 pero sin glutamato, tuvo estabilidad equivalente como las formulaciones anteriores con glutamato.

Aunque la realización anterior se ha descrito en algún detalle para fines de claridad y entendimiento, será evidente para un experto en la materia al leer la presente divulgación que pueden realizarse diversos cambios en la forma y el detalle sin salir del alcance verdadero de la invención. Por ejemplo, todas las técnicas y aparatos descritos anteriormente pueden usarse en diversas combinaciones.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador que comprende al menos una cepa del virus de la gripe y comprende además un estabilizante, que consiste en:

(a) sacarosa del 2 % al 8 % en peso/volumen (p/v); arginina del 0,75 % al 2 % p/v; glutamato del 0,02 % al 0,15 % p/v e hidrolizado de gelatina del 0,5 % al 2 % y un tampón; o

(b) sacarosa del 2 % al 8 % p/v; arginina del 0,75 % al 2 % p/v, hidrolizado de gelatina del 0,5 % al 2 % y un tampón;

en la que cada cantidad de cada uno de los componentes del estabilizante es la cantidad final en la composición del virus y la composición de virus exhibe una pérdida de potencia de menos de 1,0 log cuando se almacena durante un periodo de 3 meses a de 4 °C a 8 °C.

2. La composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador de la reivindicación 1, en la que el estabilizante consiste en sacarosa al 6,84 % p/v, arginina al 1,21 % p/v, glutamato al 0,094 % p/v, hidrolizado de gelatina al 1 % p/v y un tampón.

3. La composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador de la reivindicación 1, en la que el estabilizante consiste en sacarosa al 6,84 % p/v, arginina al 1,21 % p/v, hidrolizado de gelatina al 1 % p/v y un tampón.

4. La composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador de las reivindicaciones 1, 2 o 3, en la que al menos una cepa de virus de la gripe se selecciona de: un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a temperatura, un virus de la gripe adaptado al frío atenuado, un virus de la gripe sensible a temperatura adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a temperatura atenuado y un virus de la gripe sensible a temperatura adaptado al frío atenuado.

5. La composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que al menos una cepa del virus de la gripe comprende un esqueleto genético de ca A/Ann Arbor/6/60 o ca B/Ann Arbor/1/66.

6. La composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el tampón es un tampón de fosfato potásico.

7. La composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador de la reivindicación 6, en la que el tampón fosfato potásico comprende un 1,13 % (p/v) de fosfato potásico dibásico y un 0,48 % (p/v) de fosfato potásico monobásico.

8. La composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la arginina es monoclorhidrato de arginina y el glutamato es monohidrato monosódico de ácido glutámico.

9. La composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que una formulación de vacuna de la composición comprende entre 6,5 y 7,5 log₁₀ de unidades focales fluorescentes (FFU) de cada cepa de virus de la gripe por dosis de 0,2 ml.

10. La composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde la composición comprende al menos dos cepas del virus de la gripe.

11. La composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador de la reivindicación 10, en donde la composición comprende tres cepas del virus de la gripe.

12. La composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en donde la composición de virus exhibe una pérdida de potencia de menos de 1,0 log almacenada durante un periodo de 12 meses a de 4 °C a 8 °C.

13. Una composición inmunogénica que comprende la composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12.

14. Una vacuna que comprende la composición inmunogénica de la reivindicación 13

15. Una formulación de vacuna de la composición de virus de la gripe vivo estable a refrigerador de la reivindicación 1 que comprende:

a) al menos dos cepas del virus de la gripe, en donde:

i) Al menos una cepa del virus de la gripe comprende un esqueleto genético de ca A/Ann Arbor/ 6/60 y al menos una cepa del virus de la gripe comprende un esqueleto genético de ca B/Ann Arbor/1/66 y

ii) la formulación de vacuna comprende entre 6,5 y 7,5 log₁₀ de unidades focales fluorescentes (FFU) de cada cepa de virus de la gripe por dosis de 0,2 ml; y

5 b) un estabilizante que consiste en sacarosa al 6,84 % p/v, monoclorhidrato de arginina al 1,21 % p/v, monohidrato monosódico de ácido glutámico al 0,094 % p/v, hidrolizado de gelatina al 1 % p/v y un tampón de fosfato potásico, tampón que comprende un 1,13 % (p/v) de fosfato potásico dibásico y un 0,48 % (p/v) de fosfato potásico monobásico.

10 en donde cada cantidad de cada uno de los componentes del estabilizante es la cantidad final en la formulación de vacuna y la formulación de vacuna exhibe una pérdida de potencia de menos de 1,0 log cuando se almacena durante un periodo de 3 meses a de 4 °C a 8 °C.

15 16. La formulación de vacuna de la reivindicación 15, en donde la formulación comprende tres cepas de virus de la gripe.

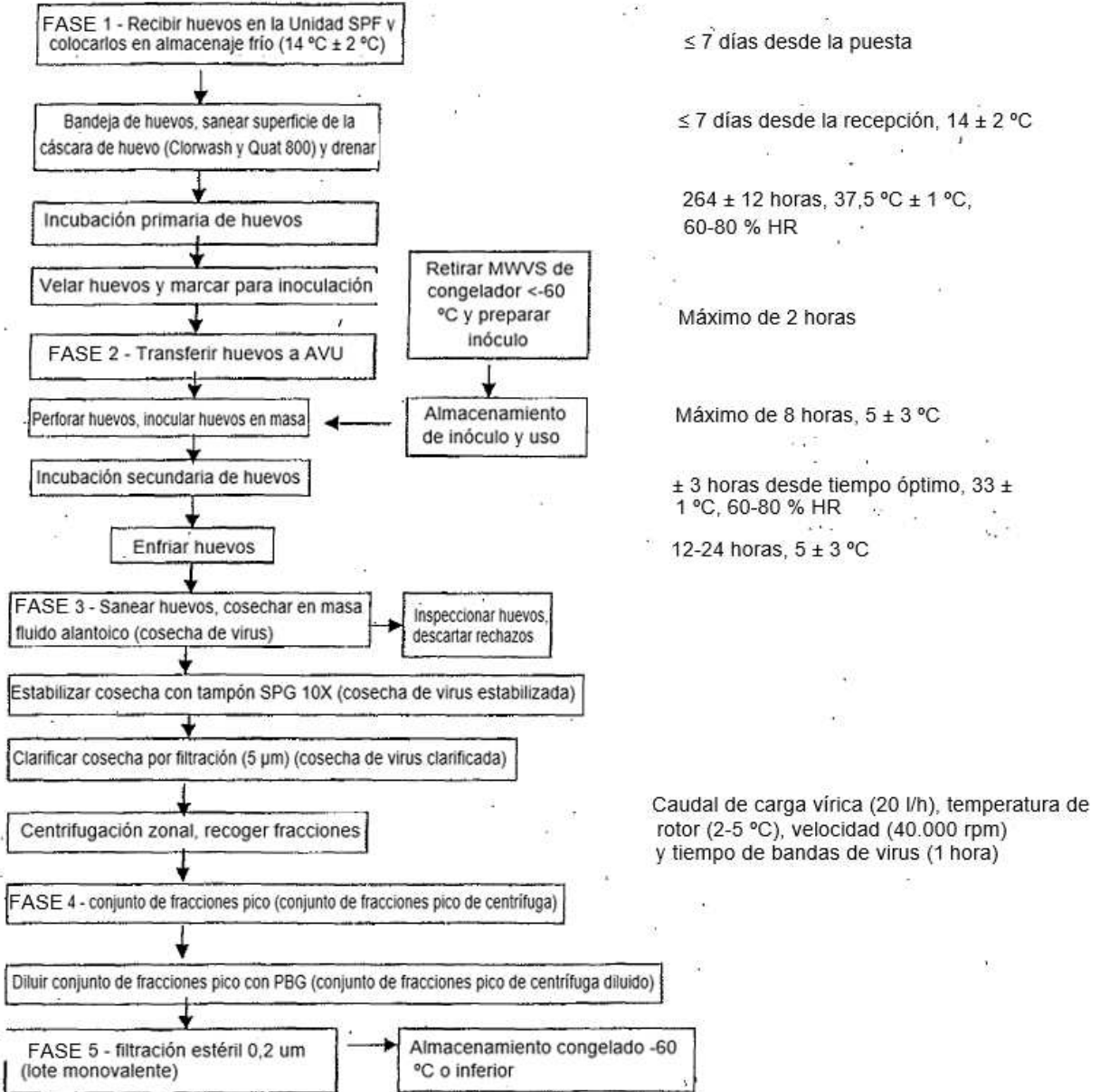
17. La formulación de vacuna de las reivindicaciones 15 o 16, en donde la formulación exhibe una pérdida de potencia de menos de 1,0 log almacenada durante un periodo de 12 meses a de 4 °C a 8 °C.

18. Un kit que comprende la formulación de vacuna de las reivindicaciones 15, 16 o 17.

Figura 1
Flujo de proceso de CTM-1

Etapas de Producción de Cosecha de Virus

Parámetros del Proceso

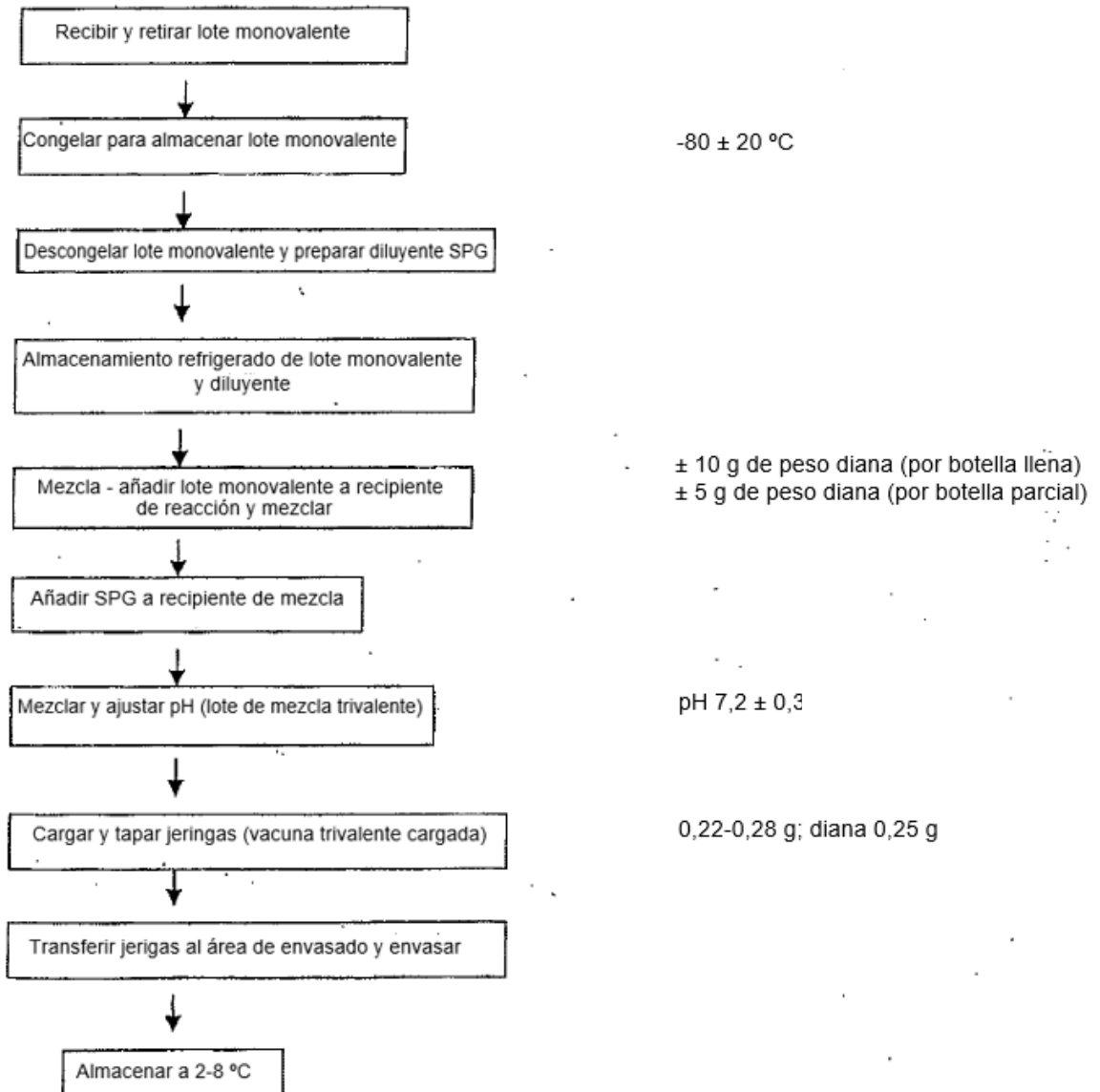


INFORME DE HISTORIA DE DESARROLLO - FLUMIST LÍQUIDO

Figura 2
Flujo de proceso de CTM-1

FASE 6 - Etapas de producción de mezcla y carga

Parámetros del Proceso



Carga centrífuga y estudios de temperatura

Cepa	Numero de lote	Volumen VH Clar. (ml)	Titulación VH Clar. (Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	Partículas totales para carga (VH Clar.)	DCP Vol (ml)	Titulación DCP (Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	Mono. Bulk (MB) (mL)	Titulación MB (Log ₁₀ TCID ₅₀ /ml)	Partículas totales para DCP o MB	Rendimiento de etapa
Lote de 5K huevos a temp. de centrifuga 14 °C.										
B/Harbin	CAZO17	34700	7,3	6,92E+11	2200	8,0	N/A*	N/A*	2,2E+11	32
Lote de 10K huevos a temp. de centrifuga 14 °C.										
B/Harbin	CAZ 015	74500	7,1	9,38E+11	3000	8,2	N/A*	N/A*	4,75E+11	51
A/Sidney	CAZ 018	70000	7,6	2,66E+12	2106	8,7	N/A*	N/A*	1,06E+12	40
A/Beijing	CAZ 020	79000	8,6	3,15E+13	2900	10,3	N/A*	N/A*	5,79E+13	184
A/Sidney	CAZ 022	54000	8,4	1,36E+13	3004	9,9	N/A*	N/A*	2,39E+13	176
	Media									113
Lote de 20K huevos a temp. de centrifuga 14 °C.										
B/Harbin	CAZ 016	95500	7,7	4,79E+12	3300	8,9	N/A*	N/A*	2,62E+12	55
A/Sidney	CAZ 019	119000	7,6	4,22E+12	N/D	N/D	4200	8,6	1,87E+12	40
A/Beijing	CAZ 021	129000	8,8	8,14E+13	3600	10	N/A*	N/A*	3,60E+13	44
	Media									46

N/D = No disponible

N/A* = No aplicable

¹Datos extraídos de "Fact on Loading Studies", excepto para CAZ 015 y 022²Data extraídos de "Fact on Loading Studies", excepto CAZ 018, 019, 021 y 022

FIG. 3

TABLA 2.3.1.1 A
CTM-1
Resumen de Datos del Ensayo QC – Resultados de la prueba en proceso

	Tipo B/Harbin/07/94			A/Sidney/05/97				A/Beijing/262/95		
	CAZ026	CAZ027	CAZ028	CAZ025	CAZ029	CAZ030	CAZ034	CAZ031	CAZ032	CAZ033
Pruebas en el proceso										
Potencia por TCID ₅₀ (log ₁₀ ml ⁻¹)***										
• Cosecha de Virus (Sin estabilizar)	8,1	8,25	8,65	8,8	7,5	6,0	7,6	9,25	8,3	8,85
• Cosecha de Virus estabilizada	7,8	8,2	8,3	7,85	7,7	7,1	7,55	9,2	9,35	9,2
• Cosecha de Virus clarificada	7,7	7,8	8,75	8,1	7,4	6,8	7,35	8,9	8,65	9,8
• Flujo a través (Sobrenadante zonal)	7,15	8,3	7,65	7,2	6,7	6,1	7,15	8,6	8,35	8,55
• Conjunto de fracción pico de centrifuga	9,0	9,25	8,7	8,8	9,45	8,7	9,2	10,4	>10,2	10,5
• Conjunto de fracción pico de centrifuga diluido	8,55	8,5	9,65	8,55	8,7	8,9	8,75	10,2	10,1	9,75
• Lote monovalente (Concentrado zonal filtrado estéril)	8,35	8,4	9,85	8,55	8,35	*5,9	7,9	10,0	9,75	9,3
Carga biológica (ufc/ml)										
• Cosecha de Virus (Sin estabilizar)	80	>100	<1	<1	>100	>100	>100	>100	<1	>100
• Cosecha de Virus estabilizada	15	>100	<1	<1	>100	>100	>100	>100	>100	>100
• Conjunto de fracción pico de centrifuga diluido	23	>100	<1	<1	<1	<1	>100	<1	>100	>100
Endotoxina (Eu/ml)										
• Lote monovalente (Concentrado zonal filtrado estéril)	135,8	586,9	**258,9	52,84	36,27	263,2	<5	11,43	21,67	25,39
Concentración de sacarosa (%)										
• Conjunto de fracción pico de centrifuga	42,05	40,65	39,85	40,6	39,1	31,6	40,4	40,65	43,45	41,2
• Lote monovalente (Concentrado zonal filtrado estéril)	7,5	7,5	7,6	7,5	7,5	7,4	7,7	7,9	7,5	8,1

*CAZ030 no se aceptó para procesamiento adicional debido a baja titulación

**Muestra de endotoxina de la Fase de Cosecha

***Promedio de Valores QC informados

FIG. 4

TABLA 2.3.1.1 B
CTM-1
Rendimientos Promedio para A/Beijing, A/Sidney, B/Harbin

FLUMIST
 Líquido

Etapa de proceso	Cepa					
	A/Beijing ¹		A/Sydney ²		B/Harbin ³	
	% rendimiento de etapa	% Rendimiento global	% rendimiento de etapa	% Rendimiento global	% rendimiento de etapa	% Rendimiento global
Cosecha de virus estabilizada	N/A	100	N/A	100	N/A	100
Cosecha de virus clarificada	147	147	78	78	125	125
Conjunto de fracción pico de centrifuga	19	10	60	30	14	8
Conjunto de fracción pico de centrifuga diluido	391	35	441	124	2158	75
Lote monovalente	42	16	30	13	89	93

¹Promedio de la etapa y rendimientos globales de la tabla 2.3.1.2C

²Promedio de la etapa y rendimientos globales de la tabla 2.3.1.3C

³Promedio de la etapa y rendimientos globales de la tabla 2.3.1.4C

Note: los valores de % de rendimiento global anteriores se calcularon como el promedio de los valores de % de rendimiento global para cada etapa de proceso a partir de las tablas 2.3.1.2C, 2.3.1.3C y 2.3.1.4C. Como resultado, los % de rendimiento global en cada etapa no son consistentes con los % de rendimiento global que se calcularían multiplicando cada rendimiento de % de etapa sucesivo en esta tabla. El método de cálculo usado aquí refleja mejor los rendimientos de proceso reales a través de la campaña.

FIG. 5

Tabla 2.3.1.1 C

FLUMIST líquido CTM-1 Resumen de datos de ensayo QC - resultados de prueba de liberación de lote monovalente

		B/Harbin/07/94-like			A/Sidney/05/97			A/Beijing/262/95			
		CAZ026	CAZ027	CAZ028	CAZ025	CAZ029	CAZ030	CAZ034	CAZ031	CAZ032	CAZ033
Certificado de pruebas de análisis (C de A)											
PRUEBA ESPECIFICACION											
Cosecha de Virus (sin estabilizar)											
• Mycoplasma	Ninguna detectada	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	NA	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
• M. tuberculosis	Ninguna detectada	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	NA	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
• ALV (ELISA)	No se detecta ALV	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	NA	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
• virus extraño <i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	No se detecta virus extraño	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	NA	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
• Prueba RT	Negativo para enzima RT	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	NA	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
• Genotipo	2 genes WT /6 genes CA	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	NA	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
• Fenotipo	genes ca y ts	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	NA	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
• Atenuación	No síntomas tipo gripe en hurones	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	NA	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
• Identidad TCID ₅₀ Neutralizado No neutralizado	No efecto citopático	<1,3	<1,3	<1,4	<1,3	<1,3	NA	<1,3	<1,3	<1,3	<1,3
	Efecto citopático	8,7	8,3	8,6	9,1	7,9	NA	8,2	9,65	8,8	9,1
Lote monovalente (concentrado zonal filtrado estéril)											
• Esterilidad		Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa	NA	Pasa	Pasa	Pasa	Pasa
Disposición de lote		Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación

NA - No Aplicable (prueba no realizada)

FIG. 6