



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 165 367**

51 Int. Cl.:

C12N 7/02 (2006.01)

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 7/06 (2006.01)

C12N 7/08 (2006.01)

C12P 21/02 (2006.01)

A61K 39/25 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA MODIFICADA

T5

96 Número de solicitud europea: **93917150 .0**

96 Fecha de presentación : **13.07.1993**

97 Número de publicación de la solicitud: **0651789**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **10.05.1995**

54

Título: **Procedimiento para prevenir el herpes zoster o para aliviar la neuralgia post-herpética relacionada con la varicela.**

30

Prioridad: **17.07.1992 US 915141**

45

Fecha de publicación de la mención y de la traducción de patente europea: **16.03.2002**

45

Fecha de la publicación de la mención de la patente europea modificada BOPI: **05.08.2009**

45

Fecha de publicación de la traducción de patente europea modificada: **05.08.2009**

73

Titular/es: **Merck & Co., Inc.**
126, East Lincoln Avenue, P.O. Box 2000
Rahway, New Jersey 07065-0900, US
The Regents Of The University Of Colorado

72

Inventor/es: **Calandra, Gary, B.;**
Provost, Philip, J.;
Levin, Myron, J. y
White, C. Jo

74

Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 165 367 T5

DESCRIPCIÓN

Procedimiento para prevenir el herpes zoster o para aliviar la neuralgia post-herpética relacionada con la varicela.

5 **Antecedentes de la invención**

La neuralgia post-herpética es la morbilidad predominante asociada con el desarrollo de herpes-zoster, también conocido como herpes. La neuralgia típicamente dura de uno a seis meses y a menudo es muy dolorosa.

10 En los últimos años se han ido acumulando indicios que demuestran que el herpes-zoster se produce por una reactivación del virus de la varicela latente [Straus y col., *Ann. Int. Med.* (1988); 108, 221-237; Hyman y col., *Lancet* (1983) 2, 814-816; Gilden y col., *Nature* (1983) 306, 478-80; Croen y col., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988); 85, 9773-9777; Mahalingham y col., *New Eng. J. Med.* (1990) 323, 627-631]. La infección inicial de varicela puede haberse producido como resultado de la varicela infantil o como resultado de la inmunización con una vacuna de virus de varicela zoster vivos atenuados para prevenir la varicela. En cualquier caso, parece ser que el virus permanece en
15 el sistema del individuo infectado durante mucho tiempo desde la varicela o la vacunación. Parece ser que el sitio de la latencia del VZV son las células neurales existentes dentro de los ganglios de raíz dorsales.

Años después de que el VZV haya pasado a un estado de latencia, el virus se reactiva por un mecanismo que aún se
20 conoce poco. Sin embargo, la reactivación de VZV y su posterior replicación produce el herpes zoster. En el transcurso y después de esta reactivación de VZV es cuando se desarrolla la neuralgia post-herpética grave.

Numerosas publicaciones bibliográficas han sugerido que puede haber una correlación entre una competencia inmune disminuida y la reactivación de herpes zoster desde su estado latente. Las sugerencias del mecanismo por el cual
25 se produce la reactivación incluyen la disminución de la inmunidad basada en células, tal como la reducción del número de linfocitos T sanguíneos que llevan el receptor CD4⁺, que son responsables del reconocimiento de los antígenos que no son autoantígenos presentados por las moléculas del MHC (complejo principal de histocompatibilidad) de tipo II después de la fagocitosis de VZV. Como alternativa, también se ha sugerido como mecanismo posible permisivo para la reactivación de VZV la reducción de los niveles de los linfocitos T CD8⁺, responsables de la destrucción de
30 las células en las que las moléculas del MHC de tipo I reconocen y presentan antígenos que no son autoantígenos. Neumeyer y col., [*N.E.J. Med.* p. 1456, 29 de mayo, 1986] detectaron una reducción en la relación de CD4⁺/CD8⁺ antes de la aparición del herpes zoster, y un posterior aumento de la relación tras la terminación del síndrome clínico.

En un estudio, se administró una vacuna de varicela a sujetos de edad avanzada con la intención de reforzar
35 sus respuestas CMI a VZV. Se realizó la inmunización contra VZV de estos individuos seropositivos a causa de la reducción de la CMI específica para VZV relacionada con la edad descrita previamente [Miller AE., *Neurology*. (1980); 30, 582-587; Berger R, Florent G. Just M., *Infect. Immun.* (1981); 32, 24-27; Burke BL, Steele, RW, Beard OW., *Arch. Intern. Med.* (1982); 142, 291-293] y de la posibilidad de que la reactivación de VZV relacionada con la edad (como herpes zoster) sea una consecuencia de esta reducción. Esta vacuna viva atenuada se toleraba bien; no
40 apareció ninguna reacción local o sistémica grave y las reacciones leves no fueron muy comunes. Ocasionalmente se produjo una extensión sistémica del virus de la vacuna, manifestada por un exantema cutáneo mínimo (posiblemente en 6/245 inyecciones). Aunque teóricamente esto tiene importancia en pacientes de edad avanzada con una reducción documentada de la inmunidad específica mediada por células, las lesiones resultantes y los síntomas no tuvieron significado clínico. Este hecho es coherente con las observaciones anecdóticas de que los abuelos seropositivos no se
45 infectan después de la exposición a los nietos con varicela.

Los déficits en la inmunidad específica para VZV en las personas de edad avanzada se producen en el contexto de la reducción de las respuestas CMI. Éstas se detectan en ensayos de respuestas cutáneas de hipersensibilidad retrasada [Goodwin JS, y col., *Clin. Exp. Immunol.* (1982); 48, 403-410] y en respuestas proliferativas *in vitro* de
50 linfocitos T estimulados por mitógenos [Hayward AR, y col., *J. Clin. Immunol.* (1987); 7, 174-178; Tice RR, y col., *J. Exp. Med.* (1979); 149, 1029-1041; Murasko DM, y col., *Am. J. Med.* (1986); 81, 612-618]. La mayoría de los estudios documentan un número normal de células T, pero hay una reducción en las células CD4⁺ [Nagel Je, y col., *J. Immunol.* (1981); 127, 2086-2088; Thompson JS, y col., *J. Am. Geriatric Soc.* (1984); 32, 274-281]. En estos pacientes, los números y las funciones de las células destructoras naturales son normales [Hayward AR, Herberger M., *J. Clin. Immunol.* (1987); 7, 174-178; Nagel Je, y col., *J. Immunol.* (1981); 127, 2086-2088]. Un aumento del tiempo del ciclo celular, como se sugiere en el estudio de Tice y col., sería una posible explicación de la pérdida de CMI con el envejecimiento [Tice RR, y col., *J. Exp. Med.* (1979); 149, 1029-1041]. Sin embargo, los estudios posteriores no apoyan un cambio en el ciclo celular ni ninguna reducción en el grado de expansión clonal después de la estimulación de antígenos [Staiano-Coico L, y col., *J. Immunol.* (1984); 132, 1788-1792; Sohnie PG, y col., *Clin. Exp. Immunol.* (1982); 47, 138-146]. En su lugar, los análisis de ADN muestran un aumento de la frecuencia de lesiones de ADN, intercambios de cromátidas hermanas y pérdida celular en células de personas de edad avanzada estimuladas con mitógenos [Dutkowski RT, y col., *Mutat. Res.* (1985); 149, 505-512]. Las respuestas proliferativas reducidas a los mitógenos no están acompañadas necesariamente por una reducción de la síntesis de IL2 o IL2R [Dutkowski RT, y col., *Mutat. Res.* (1985); 149, 505-512]. El defecto más consistente encontrado por Chopra y col., fue el aumento de
60 la producción de interferón gamma y la reducción de la supervivencia de las células estimuladas, que apoya el uso de un refuerzo [Chopra RK, y col., *Clin. Immunol. Immunopathol.* (1989); 53, 297-308].

Otros estudios realizados en una población en envejecimiento demostraron que la reducción de la inmunidad específica para VZV que acompaña al aumento de la incidencia de HZ en la población de edad avanzada, se explica al menos parcialmente por la reducción de la frecuencia de células CD4⁺ específicas para VZV en la sangre. Sin embargo, estos pacientes tienen números normales de células T y conservan la actividad de sus células NK en respuesta al antígeno de VZV, siempre que esté presente suficiente IL2 [Hayward AR, y col., *J. Clin. Immunol.* (1987); 7, 174-178]. La frecuencia de células T que expresan el fenotipo de células de memoria (CD45RO) aumenta con la edad desde una media de 43+17% a los 28 años a 65+14% a los 70 años, de forma que la reducción de la inmunidad específica para VZV con el envejecimiento no se debe a una pérdida selectiva de esta subserie. Las células CD45RO⁺ fabrican más interferón γ que las células CD45RA⁻, lo cual se correlaciona con los resultados de Chopra y colaboradores.

Sea cual sea el mecanismo de represión o reactivación del herpes zoster, ninguna evidencia médica ha demostrado de forma eficaz la prevención de la reactivación del herpes zoster (zoster) o la disminución de la neuralgia post-herpética. Los agentes quimioterapéuticos como clase han sido catastróficos en el tratamiento de esta afección dolorosa [Watson, C. P. N., *Neurol. Clin.*, 7, 231-248 (1989); Straus, y col., *Ann. Int. Med.* 108, 221-237 (1988)].

Starr y col., "Immunization of Healthy seropositive middle aged and elderly adults with varicella-zoster virus (VZV) vaccine" ("Inmunización de adultos sanos seropositivos de edad media y avanzada con la vacuna del virus varicela-zoster"), en *Programs and Abstracts of the Twenty-Seventh Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Nueva York, NY, 4-7 de octubre, 1987, página 313, midieron un aumento en los niveles de anticuerpos contra VZV hasta cuatro meses después de la vacunación. No hay descripción ni apreciación de que esto pueda predecir una reducción de la incidencia o gravedad de la neuralgia post-herpética.

Hayward y col., *J. Infectious Diseases*, 163, 1991, 873-875 describen la medición de los niveles de anticuerpos y de las respuestas de células T después de la vacunación. Afirman que estas mediciones no equivalen a una reducción de la gravedad o incidencia de la neuralgia post-herpética.

Esta invención es un procedimiento para reducir la neuralgia post-herpética y para mejorar o anular la reactivación del herpes zoster. La eficacia del procedimiento se demuestra por resultados positivos obtenidos *in vivo* en los que aumenta el nivel de linfocitos específicos para VZV. Este aumento en la frecuencia de células respondedoras, RCF, inducido por la inmunización de acuerdo con el procedimiento de esta invención, produce un estado inmune *in vivo* que es refractario al estado de enfermedad, incluyendo la reactivación de VZV y la neuralgia post-herpética. La amplia investigación clínica a largo plazo, multicéntrica, en la que los individuos con riesgo reciben VZV vivo atenuado o inactivado demuestra que la inmunización de acuerdo con esta invención produce una protección significativa contra la reactivación de VZV, o, si se produce la reactivación, una reducción significativa de la duración o gravedad de la neuralgia post-herpética.

Sumario de la invención

Se describe un procedimiento para aliviar la neuralgia post-herpética y para mejorar o anular la reactivación del herpes zoster en personas con riesgo, que utiliza la estimulación antigénica con VZV. El antígeno de VZV es un virus VZV vivo atenuado o un virus VZV entero inactivado.

Los individuos con riesgo son los que han tenido varicela (varicela infantil), aunque sea subclínica, o los que se han vacunado con una vacuna de varicela viva. Tienen un riesgo particular las personas de edad avanzada o los individuos inmunocomprometidos. El estado de riesgo puede confirmarse por la presencia de anticuerpos anti-VZV en suero o por una respuesta positiva a un ensayo de antígeno VZV en la piel. Es particularmente indicativa de un estado de riesgo una frecuencia de células respondedoras a VZV inferior a aproximadamente 1 célula respondedora de 68.000, mientras que se alcanza un estado protegido cuando la RCF se aproxima a 1 célula respondedora de 40.000.

Los individuos con riesgo reciben el antígeno de VZV en una cantidad inmunológicamente eficaz y se controlan con respecto a la vuelta al estado de riesgo, momento en el que puede realizarse otra inmunización.

La eficacia del procedimiento se demuestra por los resultados positivos obtenidos en una amplia investigación clínica a largo plazo, multicéntrica.

Descripción detallada de la invención

En el procedimiento de esta invención, un individuo con riesgo de desarrollar herpes zoster se inmuniza con un antígeno de VZV para inducir la elevación de las respuestas inmunes anti-VZV. Esta inmunización reduce la gravedad de la neuralgia post-herpética asociada con la reactivación de VZV, y reduce o previene la propia reactivación.

De esta forma, la presente invención proporciona el uso de un virus de varicela zoster (VZV), el cual es un virus VZV vivo atenuado o un virus VZV entero inactivado, para la fabricación de una vacuna para inmunizar a una persona de más de cincuenta años que haya tenido varicela o que se haya vacunado con una vacuna de varicela viva, para reducir la duración o la gravedad de la neuralgia post-herpética y para mejorar o anular la reactivación del herpes zoster.

Preferiblemente, el VZV es una cepa Oka atenuada.

ES 2 165 367 T5

Preferiblemente, la inmunización se realiza por vía subcutánea. Preferiblemente, para la inmunización se usan al menos 1.000 unidades formadoras de placas (PFU).

Preferiblemente, la cepa Oka del virus de varicela zoster atenuado se almacena en estado liofilizado antes de la inmunización. Más preferiblemente, se reconstituye desde el estado liofilizado con agua destilada antes de la inmunización.

Un individuo con riesgo incluye cualquier individuo de más de 50 años que haya experimentado varicela, aunque sea de gravedad subclínica, y cualquiera que haya recibido una vacuna del virus varicela zoster vivo. Dentro de esta clase, tienen un riesgo particular las personas que, por una razón u otra, están inmunocomprometidas. Esto puede deberse al desarrollo de una enfermedad de deficiencia inmune adquirida (por ejemplo, SIDA, ARC), a una quimioterapia o a otra terapia inmunosupresora (por ejemplo, inmunosupresión de rechazo de injertos). Además, la incidencia de zoster aumenta con la edad. Entre las personas con riesgo de más de 50 años, la incidencia es de 2,5-5,0 casos/1.000 personas/año. A los 80 años, la incidencia aumenta a 5-10 casos/1.000 personas/año. Este aumento del riesgo se correlaciona con la reducción de la inmunidad mediada por células a VZV.

Para establecer si una persona es un individuo con riesgo, sin basarse en los registros personales ni en la recolección de muestras, puede realizarse un ensayo de piel sencillo como se describe en la sección de Ejemplos mostrada más adelante. Otro procedimiento para determinar el estado de riesgo incluye la evaluación serológica, por ejemplo, por un ensayo ELISA de anticuerpos anti-VZV. Otro procedimiento es medir la frecuencia de células respondedoras específicas para VZV, RCF, y si se descubre que es de aproximadamente 1 de 68.000, el individuo supuestamente tiene riesgo. Sin embargo, para los fines de esta invención, puede considerarse que cualquier individuo está en riesgo, ya que no hay efectos secundarios conocidos asociados con la inmunización general de acuerdo con esta invención, siempre que los individuos inmunocomprometidos de forma grave, tales como los infectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) o que tienen el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) no se inmunicen con un antígeno de VZV vivo.

El antígeno de VZV puede ser un VZV vivo atenuado, preparado de acuerdo con el procedimiento descrito en la patente de Estados Unidos 3.985.615 (Takahashi) o como se describe en los siguientes ejemplos. La viabilidad de la varicela viva atenuada puede mantenerse en cualquiera de varias formulaciones estabilizadoras conocidas. El VZV Oka atenuado está depositado en la ATCC (No. de adquisición VR-795) y también está disponible en el mercado como VARIVAX[®], comercializado por Merck & Co., Inc. También pueden usarse otras cepas de VZV si están suficientemente atenuadas, de forma que no provoquen la enfermedad de tipo natural en individuos no expuestos previamente al antígeno que pueden someterse a la vacunación por primera vez, o para la producción de antígenos de VZV destruidos.

El antígeno de VZV puede ser un virus inactivado. Este material puede prepararse simplemente por un procedimiento tan sencillo como el calentamiento de una alícuota de VZV vivo y el control del número de unidades formadoras de placas (PFU) residuales por medio un ensayo apropiado, o puede inactivarse por técnicas más sofisticadas tales como irradiación gamma, durante periodos de tiempo y con intensidades conocidas. Un virus entero inactivado es obviamente tan eficaz en la presente invención como VZV vivo, y puede producirse por cualquier medio conveniente, siempre que se mantenga la integridad antigénica de VZV. Cuando se usa VZV inactivado térmicamente a una dosis de aproximadamente 10 μ g o mayor, las elevaciones en las frecuencias de células respondedoras anti-VZV son las mismas que cuando se administran aproximadamente 1000 PFU de virus vivos. Se prefiere el uso de un VZV entero inactivado, particularmente cuando el receptor está gravemente inmunocomprometido.

En el procedimiento de esta invención, sea cual sea el antígeno elegido, el VZV vivo atenuado o el virus inactivado, son útiles los siguientes indicios de dosis inmunológicamente eficaces y de la eficacia del procedimiento:

1. Aumento de la frecuencia de células respondedoras específicas para VZV en aproximadamente un 30% (RCF, véase el siguiente ejemplo).
2. Elevación de las células T citotóxicas (CTL) anti-VZV, medida por una elevación de las células CD8⁺ específicas para VZV (células destructoras, véase el siguiente ejemplo).
3. Elevación de células T adyuvantes anti-VZV, medida por una elevación de las células CD4⁺ específicas para VZV (véase el siguiente ejemplo).
4. Aumento del nivel de anticuerpos específicos anti-VZV.
5. Aumento del nivel de linfocinas, tales como interferón, o interleucina.
6. Reducción de la duración o gravedad de la neuralgia post-herpética en un individuo a un periodo menor de un mes después del desarrollo de herpes zoster.
7. Reducción de la incidencia de herpes zoster, en un nivel estadístico, por debajo de la incidencia encontrada en la población general de individuos con riesgos similares.

No hay ningún procedimiento *in vitro* aceptado generalmente para cuantificar las respuestas inmunes mediadas por células en el ser humano. Los presentes solicitantes seleccionaron cultivos de dilución limitante con análisis de RCF para este estudio porque preveían que este procedimiento sería más preciso que la medición de SI. Los dos procedimientos de análisis mostraron un refuerzo significativo en la inmunidad específica para VZV después de la inmunización. La preferencia de los presentes solicitantes por los resultados de RCF se basa en el descubrimiento de desviaciones típicas menores de la media en estos resultados en comparación con los resultados SI. Esto puede reflejar en parte el hecho de que se analicen 196 pocillos de cultivo de tejidos para conseguir una estimación de RCF, en comparación con los 6-8 pocillos de cultivo usados generalmente para calcular SI. Sin embargo, los cultivos de dilución limitante que se usaron sólo pueden proporcionar una estimación indirecta de la frecuencia de respondedores. El denominador usado en este estudio es el número de células recuperadas en un gradiente de Ficoll; de éstas, sólo la cuarta parte pertenecen a la población de CD4⁺ CD45RO⁺, que es el fenotipo de memoria a partir del cual se extraen células T respondedoras específicas para VZV [Beverly PCL., *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (1990); 159, 111-112; Hayward A, Giller R, Levin M., *Viral Immunol.* (1989); 2, 175]. Por lo tanto, es probable que la estimación de RCF de los presentes solicitantes sea una infraestimación de la respuesta a la vacunación. Sin embargo, la RCF media conseguida después de la vacunación (1/40.000) es de la misma magnitud que la conseguida después de HZ (Hayward A, Kevin M, Wolf W, Angelova G., *J. Infect. Dis.* (1991); 163, 873-875], donde probablemente la carga de antígeno VZV producido endógenamente es grande. Este nivel de inmunidad conseguido después de la vacunación también es comparable al de los individuos asintomáticos de 35 a 40 años. El refuerzo en la respuesta inmune en el estudio actual se mantuvo durante 24 meses, con una vida media prevista de 56 meses, y no era una función de la edad. Esta última propiedad es importante, ya que los individuos de edad avanzada tienen más probabilidad de desarrollar HZ y, por lo tanto, serían las dianas principales de una estrategia de vacuna preventiva.

La respuesta de RCF después de la vacunación no pudo correlacionarse con la dosis de vacuna administrada, que variaba de 1.000 a 12.000 PFU. Además, la frecuencia de sujetos respondedores no aumenta al aumentar las dosis de la vacuna. Esto podría representar indicios de replicación del virus de la vacuna en los receptores, de forma que incluso la menor dosis administrada produzca suficiente antígeno de VZV como para conseguir un efecto máximo en la RCF. Como alternativa, el contenido de antígeno de VZV relativamente grande de las dosis menores (por ejemplo, 1.000 PFU contienen aproximadamente 2 unidades de antígeno de VZV) puede ser suficiente para conseguir una inmunización máxima. Sólo las respuestas del interferón γ de las células cultivadas se correlacionaron con una mayor dosis o una menor edad.

Los efectos de la vacuna de VZV sobre los anticuerpos contra VZV fueron de una menor magnitud y de una duración más corta que los efectos sobre CMI. Probablemente, esto no es crítico para el objetivo a largo plazo de prevenir HZ, ya que se sabe que las titulaciones se reducen a los niveles iniciales en los 1 a 2 años siguientes a un episodio de HZ [Hayward A, Kevin M, Wolf W, Angelova G., *J. Infect. Dis.* (1991); 163, 873-875], y los niveles de anticuerpos contra VZV no se reducen significativamente con el envejecimiento [Miller AE., *Neurology.* (1980); 30, 582-587; Gershon AA, Steinberg SP., *Am. J. Med. Sci.* (1981); 282(1), 12-17]. Los niveles medios de anticuerpo contra VZV antes de la vacuna en los sujetos de estudio, medidos por ELISA, fueron comparables a los de adultos de control mucho más jóvenes.

La evaluación de la respuesta inmune después de la vacuna incluyó la medición de la liberación de interferón γ por MNC expuestos a antígenos de VZV. Esto se evaluó como una variable potencialmente independiente a causa de la evidencia *in vitro* de que el interferón γ se sintetiza por células destructoras naturales así como por células T específicas de antígenos [Hayward AR, y col., *Pediatr. Res.* (1986); 20, 398-401]. Tanto las células destructoras naturales como el interferón γ contribuyen a la limitación de la replicación del virus del herpes *in vitro* [Leibson PJ, y col., *J. Virol.* (1986); 57, 976-982]. Aunque se observó un aumento estadísticamente significativo en el interferón γ *in vitro* 3 meses después de la inmunización, los errores típicos fueron muy grandes. Por lo tanto, la medición del interferón γ no es una forma de predicción fiable de los resultados de la inmunización con VZV.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar adicionalmente la invención.

Ejemplo 1

55 Preparación de vacuna de VZV viva atenuada

A. Producción de VZV

El virus de la varicela zoster vivo atenuado puede prepararse de acuerdo con la descripción de la Patente de Estados Unidos 3.985.615 o por cualquiera de los otros procedimientos conocidos en la técnica.

B. Ensayo para la determinación de la producción de VZV

Las concentraciones de infectividad de las preparaciones del virus de la varicela zoster (VZV) se estimaron usando el procedimiento de recubrimiento con agarosa o de recubrimiento con líquido descrito por Kraha y col. (*J. Virol. Methods*, 1990, 27:319-326) o por Takahashi y col [*Postgrad Med. J.*] 61 (supl. 4) 736-741, (1985)]. El ensayo se realiza como se indica a continuación:

ES 2 165 367 T5

Las células MRC-5 se siembran en placas de cultivo de tejidos de 60 mm, a una concentración de 6×10^5 células en volúmenes de 5 ml de BME (Medio Basal Eagle con solución salina equilibrada de Hanks) con 100 mg/l de galactosa, 50 $\mu\text{g/ml}$ de neomicina y L-glutamina 2 mM, y se incuban a 35°C en una atmósfera con un 5% de CO_2 . Después de la incubación durante 24-48 horas, las células alcanzan una confluencia del 50-80%. El medio de crecimiento se retira por aspiración y las células se infectan con 100 μl de solución de VZV diluida en un diluyente de virus apropiado, tal como tampón SPGA, o un medio de mantenimiento líquido (LMM). El tampón SPGA contiene un 7,5% (p/v) de sacarosa, fosfato potásico 11 mM, un 0,1% de glutamato sódico (p/v) y un 1% de albúmina de suero humano. Se deja que el virus se una durante ≥ 1 hora a 35°C en una atmósfera con un 5% de CO_2 . Los cultivos de células infectadas con VZV después se recubren con 5 ml de medio de recubrimiento de agarosa (AOM) o medio de mantenimiento líquido (LMM). El medio de recubrimiento de agarosa es una mezcla de dos soluciones, medio de recubrimiento líquido (LOM) y solución de agarosa. LOM contiene medio esencial mínimo (MEM) con sales de Earle, un 2% de suero de ternero fetal inactivado térmicamente, 50 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de neomicina y L-glutamina 2 mM. La solución de agarosa se prepara calentando 4,5 g de agarosa a baja temperatura de gelificación en 100 ml de MEM durante 15 minutos a 121°C y dejando que la solución se enfríe a 45°C. AOM se prepara mezclando un volumen de solución de agarosa con 4 volúmenes de un concentrado 1,25 x de LOM a 45°C. Las placas se enfrían a 23-25°C para permitir que solidifique el AOM. Los cultivos se incuban para facilitar el revelado de las placas. Después de 6-7 días, las placas que recibieron LOM se recubren con 5 ml de solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se raspan con una pipeta Pasteur de vidrio para soltar y retirar la agarosa. Se aspira el medio de las placas que recibieron LMM y las placas se visualizan por tinción de las células con una solución de Azul de Coomassie R-250 al 2% (p/v) en etanol-ácido acético al 1%. Los recuentos de las placas son el promedio de 4-5 placas replicadas y se expresan como unidades formadoras de placas por ml (PFU/ml).

Ejemplo 2

Preparación de la Vacuna de VZV Inactivada

El VZV vivo, preparado de acuerdo con el procedimiento del Ejemplo 1 o por cualquier otro procedimiento, puede inactivarse por incubación de una alícuota del virus a aproximadamente 50°C durante un periodo de aproximadamente 5-15 días. Como alternativa, el VZV vivo puede inactivarse por exposición a irradiación gamma o a cualquier otro medio de inactivación del virus, siempre que no se comprometa la integridad antigénica del virus.

En un experimento, VARIVAX® CR453 atenuado vivo se inactivó como se indica a continuación:

Procedimiento de Inactivación Térmica: Se calentaron quinientos viales de vacuna del lote CR 453 como viales intactos, sin reconstituir, durante 12 días en un incubador a 50°C. Después del tratamiento térmico, los 500 viales calentados se marcaron con triángulos prominentes de tinta roja indeleble en el centro de cada etiqueta de vial y se almacenaron a -20°C.

Análisis

Contenido de virus infeccioso de varicela residual en la vacuna calentada: La determinación del número de unidades formadoras de placas se realizó como se describe en Takahashi y col. Postgrad Med. J. 61 (Supl. 4) 736-741 (1985). Se ensayó un total de 5 ml de material reconstituido a partir de 10 viales de vacuna calentada. Se obtuvo un valor de 2,4 unidades formadoras de placas por ml. Un ensayo convencional de vacuna no calentada dio un valor de 3830 unidades formadoras de placas por ml.

Antígeno del virus de la varicela por ensayo dot-blot: La determinación de la masa de antígeno viral se realiza por análisis dot-blot o como se describe en el Ejemplo 9 mostrado más adelante. Pos análisis dot blot, se estimó que el producto calentado contenía 9,8 unidades de antígeno por ml. Se estimó que la vacuna no calentada convencional, ensayada simultáneamente, contenía 9,4 unidades de antígeno por ml.

Análisis de antígeno por inmunotransferencias: se usó un procedimiento de transferencia de Western experimental modelado después de los procedimientos usados para otros agentes para comparar los antígenos presentes en las vacunas calentada y normal. Los dos productos parecían muy similares entre sí, dentro de los límites de observación visual de las manchas de inmunotransferencia que reaccionaban con un antisuero policlonal humano o con un anticuerpo monoclonal contra la glicoproteína viral I.

Se usaron muestras de VZV inactivado entero como se ha descrito anteriormente como inmunógeno para activar las respuestas inmunes mediadas por células contra el herpes zoster. Se administraron dosis iguales, equivalentes a aproximadamente 10.000PFU de VZV vivos o inactivados, a personas con riesgo de desarrollar herpes zoster. A continuación se resumen la respuesta de anticuerpos (Ab) y la frecuencia de células respondedoras a VZV (RCF) antes y 3 meses después de la inmunización:

ES 2 165 367 T5

	Inactivada	Viva
Vacuna		
Número de	33	33
5 receptores		
Edad de los	67 ± 7	64 ± 6
receptores		
10 Titulación de Ab	37,4	51
inicial	(15-91)	(21-123)
Titulación de Ab a	98,7	124,5
15 los 3 meses	(42-227)	(58-226)
RCF inicial	1/63.000	1/71.000
	(1/31.000-	(1/40.000-
20	1/126.000)	1/127.000)
RCF a los 3 meses	1/23.980	1/27.400
	(1/8, 275-1/69,	(1/11.388-
25	484)	1/66.436)

Estos datos indican que se consigue un aumento sustancial de las respuestas inmunes anti-VZV, tanto si la inmunización es con VZV vivos como si es con VZV inactivados.

Ejemplo 3

Ensayo anti-VZV en la piel

El ensayo de varicela en la piel se realiza mediante la introducción por vía subcutánea de un antígeno de VZV o un antígeno de control, seguida de la medición de los cambios eritematosos durante aproximadamente 48 horas desde la introducción del antígeno. Por consiguiente, para realizar en ensayo en la piel puede usarse el procedimiento de Kamiga y col., [J. Inf. Dis. 136, 784-788 (1977)] Babu y col., [J. Clin. Microbiol. 25, 2193-496, (1987)] o Lafussa y col., [J. Inf. Dis. 152, 869-875 (1985)]. Como alternativa, para proporcionar el antígeno de VZV podría usarse el antígeno inactivado, preparado como se describe en el Ejemplo 2, o el antígeno purificado del Ejemplo 3. En cualquier caso, Takahashi [Adv. Virus. Res. 28, 285-356 (1987)] demostró que el resultado negativo del ensayo de antígeno en la piel se correlacionaba la susceptibilidad a la infección por varicela. Con respecto a esto, se prefieren las glicoproteínas de VZV con pesos moleculares de 15.000 y 45.000, que están muy asociadas con la inmunidad mediada por células, como indicadores de la susceptibilidad a reactivación de zoster.

Ejemplo 4

Ensayo para determinar la frecuencia de células respondedoras a VZV

Las frecuencias de células que responden a VZV pueden medirse de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, M. Zauderer [Handbook of Experimental Immunology, Volumen 2 - Cellular Immunology, Blackwell Scientific Publications, D.M. Weir, y col., - editores, (1986) - Capítulo 65] describe un análisis de dilución limitante. Véase también la descripción del Ejemplo 7 mostrado más adelante, sección 5: "Determination of the frequency of blood mononuclear cells (MN) which proliferate in response to VZV antigen" ("Determinación de la frecuencia de células mononucleares (MNC) sanguíneas que proliferan en respuesta al antígeno de VZV").

De acuerdo con el procedimiento de esta invención, se consiguen niveles de células respondedoras que se aproximan a aproximadamente una célula respondedora de 40.000, que es el mismo nivel de RCF encontrado en los individuos después de sufrir un episodio de herpes zoster.

Ejemplo 5

Ensayo del nivel de células T citotóxicas contra VZV

Ensayo de citotoxicidad contra VZV: Se separan monocitos de células periféricas (PBMN) y se cultivan con VZV vivo, en micropocillos, a una densidad de 10^4 células/pocillo. Después de 7 días, se añade 1 unidad de IL2 a cada pocillo y el cultivo se continúa durante 10 días, después de lo cual las placas se examinan visualmente para detectar

ES 2 165 367 T5

los pocillos con crecimiento. Se recuperan las células inmaduras de esos pocillos, y se re-estimulan con el antígeno homólogo y las células EBV autólogas (irradiadas con 5000r) y 10 u/ml de IL2 durante una semana de expansión clonal. El uso de VZV vivo para la estimulación en este contexto procede de la evidencia de Braciale y colaboradores [Immunol. Rev., 98, 95 (1987)] de que se requiere un estímulo de virus vivos para inducir respuestas restringidas de clase I, y de los datos [Arbeit y col., Intervirology 18, 56 (1982)] de que los monocitos se pueden infectar por VZV, y de la necesidad de células autólogas que llevan tanto la clase I como la clase II para la presentación del antígeno.

En las células de los pocillos respondedores se ensaya la restricción del MHC principalmente por inhibición de la citotoxicidad [Gaston y col., Immunogenetics 19, 475-486 (1984)]. Las células T se suspenden a una densidad de 10^6 /ml y se añaden 10^5 células a 5×10^3 dianas autólogas o no relacionadas preincubadas con VZV. La restricción del MHC se determina (1) determinando el fenotipo de una alícuota de las células efectoras para CD4 y CD8 y (2) añadiendo 1 μ g/ml de W6/32 (ATCC Hybridoma Bank HB 95, anti-Clase I) o HB55 (ATCC, anti-Clase II) a los ensayos de citotoxicidad. Estos anticuerpos son adecuados porque reprimen el desarrollo de las células citotóxicas restringidas a la clase I y a la clase II respectivamente en cultivos de linfocitos mixtos. Después de 6 horas de incubación, se mide la liberación de ^{51}Cr de las células diana.

Las células citotóxicas restringidas al MHC de clase I se identifican como inhibibles por W6/32 y el fenotipo CD8. Las células citotóxicas restringidas a la clase II se inhiben por HB55 y los efectores son CD4. Se comparan los resultados de PBMN obtenidos a diferentes intervalos después de un episodio de VZV agudo en adultos jóvenes, y antes y después de la inmunización de refuerzo con OKA.

Ejemplo 6

Inmunización de adultos con riesgo de desarrollar herpes zoster

1. Población

Se vacunaron individuos de 55 a 87 años de edad que tenían una historia de varicela previa, pero que no habían tenido HZ. Se excluyeron los que tenían una enfermedad debilitante o inmunosupresora y los que habían recibido una terapia inmunosupresora. También se excluyeron los que habían recibido otra vacuna o los que se preveía que recibieran otra vacuna en el mes previo a la vacunación con VZV, y los individuos que recibieron una terapia con gammaglobulina en los tres meses anteriores a la vacunación con VZV.

2. Vacuna

La vacuna viva atenuada viva (Cepa Oka/Merck) se almacenó a -20°C en estado liofilizado y se reconstituyó con agua destilada a una titulación de infectividad de 1.140 pfu/0,5 ml (lote CR 452) o 3.010 pfu/0,5 ml (lote CR 320). También pueden emplearse otros virus de varicela zoster vivos atenuados. El virus Oka preferido puede prepararse de acuerdo con la descripción de la Patente e Estados Unidos 3.985.615.

3. Diseño

Los individuos a vacunar se estratificaron por edad (55-59; 60-64; 65-69; 70-79; ≥ 80 años). Los individuos de cada grupo de edad se asignaron aleatoriamente a recibir una de cuatro dosis de vacuna por vía subcutánea: 3.010 pfu; 6.020 pfu; 12.040 pfu; o 3.010 pfu con una dosis de refuerzo de 3.010 pfu 3 meses después de la primera dosis. También se eligieron aleatoriamente individuos de 55-59 años para recibir 1.140 pfu.

Se obtuvo sangre de los individuos vacunados para la evaluación inmunológica justo antes de la inmunización y a los 3, 12 y 24 meses después de la inmunización. También se obtuvo sangre tres meses después de la dosis de refuerzo.

En los individuos vacunados también se siguieron las reacciones a la vacuna durante 42 días por medio de llamadas telefónicas cada dos semanas. Los individuos vacunados también anotaron los signos y síntomas en una ficha de vacunación. Midieron sus temperaturas corporales diariamente durante 5 días después de la vacunación, y posteriormente sólo cuando sentían fiebre. Las personas que mostraron reacciones inusuales se evaluaron individualmente. Las lesiones cutáneas se cultivaron para comprobar la presencia de VZV. Se pidió a los pacientes que llamaran si consideraban que habían desarrollado HZ. Además, durante el primer año se les llamó una vez al mes para preguntar acerca del HZ, y se les preguntó lo mismo al final del segundo año. Las lesiones cutáneas o los síndromes asociados que se considera que representan HZ se investigaron por medio de exámenes físicos, cultivos de lesiones para comprobar la presencia de VZV, y evaluación inmunológica específica de VZV aguda y convaleciente (4-6 semanas después de sospechar el desarrollo de HZ).

4. Detección de Anticuerpos IgG contra el Antígeno VZV por Ensayo sobre Inmunoabsorbente con Enzima unida

Las filas A a D de 11 placas IMMULON® (Dynatech, Alexandria, VA; No. Cat. 011-010-3450) se recubrieron con 0,1 ml de antígeno de VZV y las filas E a H se recubrieron con antígeno de control (M.A. Bioproducts, Walkerville, MD; No. de Cat. 30-149J para el antígeno de VZV; 30-150J para el control) diluido 1:20 en solución salina tamponada con fosfato (PBS; 0,15 M, pH 7) durante una noche a 4°C . Las placas se aclararon en PBS y se bloquearon con 1 mg/ml de gelatina en PBS durante una noche. Se añadieron sueros de pacientes y de control positivos a los pocillos de

ES 2 165 367 T5

antígeno y de control en diluciones 4 x (partiendo de 1:50) y se incubaron durante una noche a 4°C. Las posteriores incubaciones se realizaron con IgG de cabra anti-humana purificada por afinidad y conjugada con peroxidasa (Tago, Burlingame, CA; No. Cat 2390), diluida a 1:2000 en PBS, y con sustrato ABTS (Sigma, St. Louis, MO). Se desarrolló color durante 30-60 minutos, y la DO se leyó en un lector de placas DYNATECH con un software ELISACALC. Las densidades ópticas de los pocillos de control se restaron de los pocillos de VZV. En todas las placas se procesó una alícuota de un solo suero de referencia positivo y se calculó una línea de regresión para el log (dilución) frente al log (DO). El anticuerpo contra VZV en las muestras de los sujetos se expresó como un porcentaje del suero de referencia.

5. Determinación de la Frecuencia de Células Mononucleares (MNC) Sanguíneas que Proliferan en Respuesta al Antígeno de VZV

Se separaron MNC de sangre heparinizada por centrifugación de Ficoll-Hypaque, se lavaron en solución salina equilibrada de Hanks y se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con anticuerpos y con un 10% de suero autólogo. Los detalles de los cultivos de dilución limitante usados para determinar la frecuencia de células respondedoras (RCF) están publicados [Feldman S, y col., Am. J. Dis. Child. 126, 178-184 (1973)]. En resumen, se cultivaron 24 cultivos replicados que contenían 100.000, 50.000, 25.000 y 12.500 MNC por pocillo con una dilución 1:200 del antígeno de VZV sin células durante 10 días, y después se sometieron a pulsos de 0,25 μ Ci de [3 H]timidina (TRK 61, Radiochemical Centre, Amersham; 5 Ci/mmol) por pocillo durante 8 horas. Los cultivos de control paralelos fueron idénticos, con la excepción de que se estimularon con un antígeno de control diluido preparado a partir de células no infectadas. Las células respondedoras se definieron como las que tenían más cpm de la media más 3 SD de los 24 cultivos de control replicados paralelos. La RCF se interpoló en un gráfico del log del porcentaje de pocillos no respondedores frente al número de células por pocillo, como el punto al que el 37% de los pocillos estimulados con antígeno de VZV fueron no respondedores [Henry C, y col., En Mishell BB, Shiigi SM eds. *Selected Methods in Cellular Immunology*. San Francisco: Freeman Press, (1980)]. La RCF se expresa como el número medio de MNC requeridos para detectar una célula proliferativa específica de VZV.

En el 2% de los sujetos, las cpm medias en los pocillos no estimulados que contenían 10^5 células aumentaron artefactualmente el porcentaje de pocillos no respondedores. Por lo tanto, en esta subserie de sujetos, los presentes solicitantes calcularon la RCF a partir de los puntos de datos a 12.500; 25.000; y 50.000 células por pocillo. La gran confianza puesta en los puntos de datos a menores números de células en esos sujetos se justifica por la mayor linealidad de los puntos de datos.

Para obtener un índice de estimulación a partir de estos cultivos, se determinó la media aritmética para los pocillos estimulados y no estimulados, y se expresó como (cpm de estimulados/cpm de no estimulados).

6. Producción de Interferón γ en Cultivos de MNC estimulados con VZV

Se incubaron cultivos de 5×10^5 MNC en 0,5 ml con una dilución 1:20 de antígeno de control o antígeno de VZV. Después de 5 días, los sobrenadantes se ensayaron con respecto a la presencia de interferón γ por ELISA (Amgen, ABC 3.000; Thousand Oaks, CA). Los resultados se expresan como unidades internacionales (UI)/ml.

7. Aislamiento de VZV

Se intentó aislar VZV a partir de lesiones cutáneas mediante cultivo en fibroblastos de pulmón embrionario humano (obtenidos internamente; pasada 10 a 20) después de raspar las pápulas o vesículas y de frotar vigorosamente la base. El VZV se identificó por inmunofluorescencia específica.

8. Análisis estadísticos

Se realizaron comparaciones sencillas con ensayos t de Student a un nivel de significado de 0,05 con ajuste de Bonferroni cuando fue apropiado. Los efectos del sexo, edad, dosis de vacuna y número de meses después de la inmunización se evaluaron por medio de análisis de medidas repetidas [Laird NM, Ware JH., *Biometrics* (1982); 38, 963-974; Jennrich R, Schluchter MD., *Biometrics* (1986); 42, 805-820]. Para investigar la duración de la inmunidad, se aplicaron modelos polinomiales inversos usando un análogo no lineal del modelo de Laird y Ware [Nelder JA., *Biometrics* (1966); 22, 128-141; Hirst K, y col., *Commun. Stat.* (1991): B20].

Resultados

Se inmunizó un total de 202 individuos. La edad media de los 138 individuos vacunados del sexo femenino fue de $65,8 \pm 7,3$; la edad media de los 64 individuos vacunados del sexo masculino fue de $67,7 \pm 6,5$ años. De ocho a 15 sujetos de todas las categorías de dosificación tenían ≥ 80 años de edad.

ES 2 165 367 T5

La vacuna generalmente se toleró bien. Menos de un 25% de los individuos vacunados tuvieron reacciones locales.

TABLA 1

Reacciones locales a la vacuna de la varicela en individuos inmunes de edad avanzada

Tipo	<u>Reacciones</u>	
	Primera Inyección ¹ (%)	Inyección de Refuerzo ² (%)
Eritema	47 (23)	3 (7)
Hinchazón	30 (15)	2 (5)
Sensibilidad anormal	22 (11)	0
Eritema/Hinchazón	29 (14)	0
Eritema/Hinchazón/ Sensibilidad anormal	13 (6)	0

¹n = 202

²n = 43

30

Estas reacciones constaban de eritema, hinchazón, y/o sensibilidad anormal. La duración media de las reacciones locales fue de 2,9 días para el eritema, de 2,9 días para la hinchazón y de 3,6 días para la sensibilidad anormal. Estas reacciones no fueron más frecuentes ni más severas en los individuos vacunados que recibieron dosis de refuerzo. Aparecieron temperaturas mayores de 37°C en <1% de los individuos vacunados.

35

TABLA 2

Quejas en las 6 semanas siguientes a la vacuna de la varicela en individuos inmunes de edad avanzada

40

Frecuencia	Tipo
4%	Dolor de cabeza
<3%	Irritación de ojos, rigidez de cuello, dolor muscular, exantema
<2%	Artralgia, dolor abdominal
<1%	Dolor de garganta, dolor de oídos, hinchazón de ganglios, náuseas, tos, diarrea, fiebre (>37°C)

55

En ≤ 4% de los individuos vacunados aparecieron otros síntomas leves.

60

65

ES 2 165 367 T5

Once pacientes se quejaron de un exantema en los 40 días posteriores a la vacunación.

TABLA 3

Exantema después de la vacuna de la varicela para individuos inmunes de edad avanzada

-- Exantema Precoz (< 40 días)--

			VZV
Tipo	Pacientes ¹	Día de Inicio	VZV Aislado
Pápulas (1-10) ²	4	3, 7, 8, 14	0/4
Máculas (4;?)	2	5, 15	1/1
Eritema notable/ Induración en el sitio de inyección	2	3, 3	ND ³
Otros (contusión, dermatitis de contacto, piel seca)	3	--	ND

¹ Inyecciones totales = 245

² Los números entre paréntesis indican el intervalo del número de lesiones; desconocido para un individuo vacunado.

³ ND = No determinado

Dos de estos individuos demostraron tener sólo reacciones eritematosas locales a la vacuna. Seis individuos tuvieron exantemas macropapulares que comprendían de 1 a 10 lesiones que aparecieron de 3 a 5 días después de la inmunización. El VZV se aisló a partir de sólo uno de los cinco pacientes cuyas lesiones se ensayaron. Este VZV resultó ser de tipo silvestre por análisis de enzimas de restricción.

Los niveles de anticuerpos en sujetos de edad avanzada fueron de un 85% de los del suero de referencia de control antes de la inmunización. Después de administrar la vacuna de la varicela, los niveles de anticuerpo fueron significativamente mayores durante 12 meses ($p < 0,001$), pero no a los 24 meses después de la vacunación ($p = 0,100$). La dosis, el sexo y la edad no afectaron a esta respuesta. La producción *in vitro* de interferón γ por células T estimuladas por VZV también fue significativamente mayor ($p < 0,001$) a los 3 y 6 meses después de la inmunización (Fig. 2), pero este efecto se perdió a los 12 meses. Las mayores dosis de vacunas ($p = 0,037$) y las menores edades ($p = 0,023$) se asociaron con mayores respuestas de interferón γ .

Inmunidad Mediada por Células

Para medir la inmunidad mediada por células contra el antígeno de VZV después de la inmunización de refuerzo, los MNC de los sujetos se cultivaron usando diferentes números de células por pocillo. Estos cultivos se analizaron como cultivos de dilución limitante para obtener una aproximación a la frecuencia de células T específicas para VZV en la sangre (RCF). Se usó este enfoque porque los presentes solicitantes preveían que sería más fácil cuantificar y comparar los puntos de datos durante varios años de estudio. Antes de recibir la vacuna, los sujetos tenían una RCF media de 1:68.000 (es decir, una célula de proliferación específica para VZV por 68.000 MNC de sangre periférica). Este valor aumentó a 1:40:000 a los seis meses después de la vacunación, y permaneció significativamente por encima de los niveles anteriores a la inmunización durante 24 meses (Fig. 3) ($p \leq 0,001$). La magnitud de la mejora media en RCF probablemente es una infraestimación, ya que el 33% de los individuos vacunados que tuvieron menos de una célula respondedora en 100.000 MNC antes de la vacunación se incluyen en el análisis de los presentes solicitantes como individuos que tienen una célula respondedora. El valor absoluto de RCF a los 12 ó 24 meses después de la vacunación no era una función del sexo, de la dosis administrada o de la edad del individuo vacunado. Sin embargo, la mejora incremental en RCF (es decir, la RCF a los 12 ó 24 meses menos la RCF antes de la vacunación) fue mayor en los individuos mayores ($p < 0,05$), lo que refleja la CMI relativamente deficiente (es decir, menor RCF) en los individuos de mayor edad antes de la inmunización y el hecho de que todos los individuos vacunados respondedores

ES 2 165 367 T5

-- independientemente de la edad -- consiguieran niveles similares después de la vacunación. El modelado polinomial inverso de los datos predijo que se conseguiría una RCF máxima a los 6,34 meses, manteniéndose la mitad de este efecto durante 55,9 meses. La inmunidad posterior a la vacuna se perdió a una velocidad de 309 ± 364 células/célula respondedora/mes (límites de confianza del 95% = 0-1,047 células). La RCF se correlacionaba deficientemente con las respuestas de anticuerpos o de interferón γ .

Se observó que un grupo de individuos vacunados no tuvo más de 1 RCF/ 10^5 MNC en ningún momento después de la vacunación. Este grupo no respondedor fue similar (del 8 al 20%) en todos los grupos de edad, excepto para los individuos vacunados de más de 80 años, entre los que 5 de 8 fueron no respondedores. No hubo ninguna correlación estadísticamente significativa entre la edad y la falta de respuesta, ni la falta de respuesta se correlacionó con la dosis de vacuna administrada.

También se detectó el aumento de inmunidad contra VZV cuando los datos se expresaron como un índice de estimulación. Estos resultados se transformaron en logaritmos para el análisis porque estaban distribuidos logarítmicamente. Inicialmente, el índice de estimulación medio era de 3,44 (1 SD, intervalo 1,2-9,9); a los 3 meses era de 4,57 (1,6-12,8); a 1 año era de 4,85 (1,81-13,5) y a los dos años era de 4,58 (1,7-17,1).

Protección de HZ

En siete pacientes se evaluó la posibilidad de aparición de herpes zoster (Tabla 4) durante dos años (correspondiente a 400 pacientes-años de observación). Los resultados de este análisis se muestran en la Tabla 4 mostrada a continuación:

TABLA 4

Exantema y/o dolor después de la vacuna de la varicela para individuos inmunes de edad avanzada

Tipo	Edad	Inicio ¹ (Meses)	VZV Aislado	RCF (Agudo/ Convaleciente)	Causa ²	Duración del dolor
Úlceras Dermatoma torácico	78	1,3	0	ND ³ /1:19.000	Traumatismo local	0
Paladar duro unilateral Úlceras/ Disestesia local	69	3,5	0	1:100.000/ 1:17.000	HZ probable	0
Dermatoma Parte izquierda del cuerpo cabelludo vesículo- pustular	70	17	+	1:26.000/ 1:30.000	HZ	leve (4 días)
Dolor de oído derecho; lancinante cada 5-10 minutos; \pm alivio con aspirina	78	7	sin lesiones	1:100.000/ 1:40.000	Posible HZ	(4 días)
Vesículas en nalgas	81	2	HSV II aislado	ND ³	Reactivación de HSV II	0
Vesículas diseminadas (2 pacientes); Sin dermatoma	64/65	10	ND	ND	Ácaros de gato	0

¹ Meses después de la inmunización inicial

² Causa asignada basada en datos clínicos, virológicos e inmunológicos.

³ ND = no determinado

ES 2 165 367 T5

Uno produjo VZV en cultivos a partir de lesiones cutáneas. Otros tres tuvieron presentaciones clínicas compatibles, de los que dos mostraron mejoría en la RCF en estado convaleciente, lo que sugería una infección por VZV reciente. Un paciente tuvo una evaluación inmunológica completa y otros tres no tuvieron evaluación inmunológica porque sus lesiones no se debían a VZV. Sólo dos casos sospechosos tuvieron dolor agudo (de 4 días de duración en cada caso) y ninguno tuvo dolor después de que se curaran las lesiones (neuralgia post-herpética).

Ejemplo 7

10 *Ensayo ELISA competitivo para la cuantificación del antígeno VZV*

Como el ensayo de VZV en placa requiere mucho tiempo, no es particularmente susceptible de control en proceso. Un ELISA de antígeno de VZV rápido permite medir las cantidades de antígeno de VZV para permitir el control del crecimiento del virus durante la fabricación de la vacuna de la varicela viva. Además, este ensayo puede usarse para estimar las cantidades de antígeno de VZV en vacunas a granel sonicadas y clarificadas, y potencialmente para medir el antígeno en viales rellenos de vacuna liofilizada. En resumen, este ensayo se realiza por incubación del antígeno de VZV procedente de muestras de ensayo con suero anti-VZV en solución. Se deja que el anticuerpo libre restante se una al antígeno de VZV inmovilizado en placas de microvaloración ELISA. La cantidad de anticuerpo capaz de unirse a las placas es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno presente en la muestra de ensayo. La unión de anticuerpos a las placas se cuantifica por reacción con un anticuerpo unido a enzima anti-humano y un sustrato apropiado para proporcionar un producto coloreado que se cuantifica espectrofotométricamente.

El ELISA de antígeno de VZV y los ensayos de VZV en placa generalmente deben proporcionar datos correlativos, pero debe tenerse presente que el ensayo del antígeno de VZV detecta tanto VZV viables como VZV no viables. El ensayo de antígeno también es valioso porque proporciona una medición de la carga de antígeno total que se administra a un receptor de la vacuna de VZV.

Procedimiento de Ensayo

- 30 1. Se recubren placas ELISA con glicoproteínas (gps) procedentes de células MRC-5 infectadas por VZV o no infectadas (Ejemplo 3), y éstas se recubren con albúmina de suero bovino al 1% [fracción V, No. A-9647, Sigma], NaN_3 al 0,1% para reducir la adsorción no específica de anticuerpos en las placas. Se recubren 35 filas alternas con VZV o con antígeno de control (es decir, las filas A, C, E y G reciben gp de VZV y las filas B, D, F y H reciben antígeno gp de MRC-5 no infectadas).
2. El antígeno de ensayo clarificado (3250 g-min) se diluye en estabilizante en tubos o microtubos de 12 x 75 mm. Una preparación de antígeno de virus convencional (26 unidades/ml de antígeno de VZV por ensayo dot blot) se diluye a 1:10 y después se diluye en serie 1:1,25 veces para proporcionar concentraciones de 40 antígeno de 2,6, 2,1, 1,7, 1,3, 1,1 y 0,9 unidades/ml. Pueden incluirse diluciones adicionales para proporcionar 0,7 y 0,5 unidades/ml de antígeno. Esta serie de dilución se usa para generar una curva patrón para la medición de las cantidades de antígeno presentes en las muestras de ensayo.
3. Se diluye suero humano anti-VZV en estabilizante hasta 2 veces la dilución final deseada.
- 45 4. Se distribuyen volúmenes de trescientos μl de antígeno diluido en microtubos, se mezclan con 300 μl de suero anti-VZV diluido y se incuban a 35°C durante 15-22 minutos. El control incluye anti-VZV humano y diluyente (sin antígeno).
- 50 5. Se añaden alícuotas de 100 μl de cada mezcla de suero-antígeno a 2 pocillos recubiertos con glicoproteína de VZV (gp de VZV) por replicado y 2 pocillos recubiertos con gp de MRC-5 (4 pocillos por muestra) (por ejemplo: la muestra 1 en la columna 1, filas A, B, C y D; muestra 2 en columna 2, filas A, B, C y D; etc.).
- 55 6. Las placas se incuban durante 15 ± 1 minuto a 35°C para permitir que el anticuerpo libre (no complejo con el antígeno en solución) se una al antígeno del virus inmovilizado en las placas.
7. El anticuerpo no unido se retira por lavado y los pocillos reciben una IgG anti-humana de cabra conjugada con fosfatasa alcalina para detectar el anticuerpo humano unido.
- 60 8. Después de la incubación durante 15 ± 1 minuto a 35°C, se retira el conjugado no unido por lavado. El conjugado unido se detecta por incubación durante 15 minutos a 35°C con sustrato de p-nitrofenil fosfato disuelto en tampón de dietanolamina.
- 65 9. Después de terminar la reacción del sustrato por adición de 50 μl /pocillo de NaOH 3 M, se cuantifica el desarrollo de color (DO a 405 nm) usando un espectrofotómetro de microplacas.

ES 2 165 367 T5

Cálculos e Interpretación del Ensayo

1. Se calcula el promedio de los valores de DO respectivos replicados para los pocillos recubiertos con MRC-5 y con VZV por replicado. La experiencia ha demostrado que la DO de MRC-5 es constante entre diferentes muestras y diluciones. Por lo tanto, se promedian los valores de MRC-5 para la placa entera y se usan para corregir la unión no específica del anticuerpo primario o el conjugado a extractos de células no infectadas. La DO de MRC-5 promediada se resta de las DO de VZV promediadas respectivas para proporcionar los valores de DO específicos de VZV (ΔDO).

2. Generación de una curva patrón para medir las cantidades de antígeno:

Los valores de ΔDO de la curva patrón se representan contra las concentraciones de antígeno conocidas (unidades de VZV/l). Los datos se introducen en un programa de gráficos apropiado (por ejemplo: Cricket Graph versión 1.3, Cricket Software, Malvern, PA), se identifica la porción lineal de la curva (deberá incluir al menos 4 puntos) y se obtiene la "fórmula de ajuste a una línea" ($y = a + bx$).

3. Cálculo de las cantidades de antígeno de las muestras de ensayo: Los valores para a y b se proporcionan por la fórmula de ajuste a una línea, e y (ΔDO) es conocido. Entonces, puede calcularse el valor desconocido restante, x, que representa las unidades/ml de antígeno, y corregirse por la dilución de la muestra para obtener la concentración de antígeno de la muestra no diluida. A continuación se proporciona un cálculo general de la muestra:

Muestra	Dilución	ΔDO	Unidades/ml de antígeno a partir de la fórmula lineal	Unidades/ml de antígeno corr. por dilución
A	1:2	Y	$X = (y-a)/b$	$(X) * (\text{factor de dil.})$

La concentración de antígeno notificada es la obtenida con la muestra menos diluida que proporciona un valor de ΔDO dentro de la porción lineal de la curva patrón.

Ejemplo 8

Estudios clínicos

El procedimiento para ensayar la eficacia de una vacuna anti-zoster es el siguiente:

- Se obtiene un valor de pre-vacunación de la frecuencia de células respondedoras a VZV, de anticuerpos anti-VZV y de niveles de células T citotóxicas específicas para VZV a partir de una población de adultos susceptibles a zoster;
- Una primera población suficientemente grande de adultos susceptibles a VZV se vacuna con una vacuna de VZV viva o inactivada y una segunda población suficientemente grande (control) de adultos similares se vacuna con el diluyente de la vacuna de VZV sin el VZV vivo o inactivado;
- Se obtiene un valor de post-vacunación para la frecuencia de células respondedoras, anticuerpo anti-VZV y células T citotóxicas específicas para VZV;
- Los valores obtenidos en (c) se comparan con los valores obtenidos en (a), de tal forma que un aumento de aproximadamente un 30% en la frecuencia de células respondedoras a VZV, un aumento en los anticuerpos específicos para VZV y un aumento en las células T específicas de VZV en los 3 meses siguientes a la vacunación es indicativo de la eficacia de la vacuna anti-VZV.

REIVINDICACIONES

5 1. El uso del virus de la varicela zoster (VZV), el cual es un virus VZV vivo atenuado o un virus VZV entero inactivado, para la fabricación de una vacuna para inmunizar a una persona mayor de cincuenta años que haya tenido varicela o que se haya vacunado con una vacuna viva contra la varicela, para reducir la duración o la gravedad de la neuralgia post-herpética y para mejorar o anular la reactivación del herpes zoster.

10 2. El uso de la reivindicación 1, en el que dicho VZV es la cepa Oka atenuada.

3. El uso de la reivindicación 1 ó 2, en el que dicha inmunización se realiza por vía subcutánea.

15 4. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que se usan al menos 1.000 unidades formadoras de placas (PFU) para tal inmunización.

5. El uso de la reivindicación 2, en el que la cepa Oka del virus de la varicela zoster atenuado se almacena en estado liofilizado antes de dicha inmunización.

20 6. El uso de la reivindicación 5, en el que el virus Oka de la varicela zoster atenuado se reconstituye en estado liofilizado con agua destilada antes de la inmunización.

25

30

35

40

45

50

55

60

65