



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 357 747**

51 Int. Cl.:
A61K 39/145 (2006.01)
C12Q 1/70 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **05795012 .3**
96 Fecha de presentación : **09.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **1789084**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.05.2007**

54 Título: **Reducción del riesgo iatrogénico asociado con vacunas contra la gripe.**

30 Prioridad: **09.09.2004 EP 04255471**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
29.04.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
29.04.2011

73 Titular/es:
NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS GmbH
Emil-von-Behring-Strasse 76
35041 Marburg, DE

72 Inventor/es: **Gregersen, Jens-Peter**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 357 747 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

CAMPO TECNICO

La presente invención se refiere a la producción y control de calidad de vacunas de virus de influenza.

ANTECEDENTES DE LA TECNICA

5 Los virus de influenza para uso en la preparación de vacunas humanas se han desarrollado tradicionalmente sobre huevos de gallina embrionados, aunque las técnicas más modernas desarrollan el virus en cultivo de células de mamífero, por ejemplo, sobre células Vero, células MDCK o células PER.C6. El cambio en el sustrato de desarrollo del virus ha proporcionado una oportunidad para la re-evaluación reglamentaria de la seguridad de la vacuna de influenza. Por ejemplo, la contaminación con ADN de la célula huésped ha sido un asunto a reglamentar para las vacunas obtenidas a partir de células [1], pero no ha sido un asunto en el pasado para las vacunas desarrolladas en huevos.

10 Los principios de seguridad que rodean a las vacunas de influenza obtenidas a partir de huevos son, en consecuencia, diferentes de las que rodean a las vacunas desarrolladas en cultivo de células, estando las vacunas obtenidas a partir de células bajo un escrutinio más estrecho. Es un objeto de la invención el enfrentarse a estos principios de seguridad diferentes, y en particular, el de proporcionar procedimientos para potenciar la seguridad del desarrollo de vacunas de influenza sobre cultivo de células.

15 Levandowski (Developments in Biological Standardization, vol. 98, págs. 171-75, (1999)), expone principios de seguridad relacionados con la producción de vacuna de influenza en cultivos de células (Ver, MDCK). Se reconoce el problema de agentes accidentales replicantes en líneas de células pero no en huevos. Por ello, se sugiere rastrear las fuentes originales de virus de influenza así como los cultivos de células para ciertos agentes víricos.

20 DIVULGACION DE LA INVENCION

Por definición, el uso de sustratos de células de mamíferos para la producción de vacuna de influenza implica el cultivo de células bajo condiciones que estén bien adecuadas para el desarrollo y replicación vírica. El inventor ha comprobado que estas condiciones incrementan el riesgo de que puedan desarrollarse patógenos diferentes del virus de influenza en el cultivo de células, dando lugar, con ello, a la contaminación potencial del producto de vacuna final. Los ensayos para la contaminación no son generalmente difíciles de llevar a cabo, pero un fabricante debe conocer en primer lugar el tipo de ensayos a realizar. El inventor ha identificado riesgos de contaminación específicos, y su trabajo indica que pueden llevarse a cabo ensayos adecuados durante la fabricación con el fin de asegurar la seguridad y calidad de vacunas de influenza desarrolladas sobre cultivo de células. Algunos de los contaminantes pueden ser inocuos en un producto de vacuna final, pero su presencia puede interferir con la propagación y purificación posterior del virus influenza y, en consecuencia, su eliminación es un asunto primordial para la calidad y reproducibilidad; otros contaminantes serían perjudiciales en una vacuna final y, en consecuencia, su eliminación es un asunto de seguridad primordial.

35 El riesgo de contaminación que surge del co-cultivo vírico no carece de precedentes (por ejemplo, ciertos lotes de las primeras vacunas de virus de la polio se contaminaron con virus símico 40 ("SV40"), un virus de polioma), pero no existía ninguna divulgación previa sobre la identificación de riesgos específicos asociados con el cultivo de células para la producción de vacuna de influenza humana. Los virus de influenza desarrollados sobre cultivo de células se encuentran en riesgo particular de contaminación debido a que las cepas usadas para la producción de vacuna están cambiando cada año y, en consecuencia, han de establecerse nuevos cultivos cada año. Este cambio anual en los materiales de producción significa que cada nuevo año entraña un nuevo riesgo de contaminación, particularmente debido a que están implicados múltiples países durante la preparación de virus sembrados por los fabricantes, incrementándose, en consecuencia, el riesgo de desarrollo paralelo de agentes patógenos accidentales.

45 El inventor ha identificado agentes infecciosos que pueden desarrollarse en las condiciones usadas para el desarrollo de virus de influenza en cultivo de células, pero que no se desarrollan en huevos de gallina. Estos agentes infecciosos representan un nuevo riesgo de contaminación para vacunas de influenza que nunca ha concernido a las vacunas de influenza tradicionales. De acuerdo con ello, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una vacuna de influenza a partir de virus de influenza que se desarrolla en un cultivo de una línea de células Vero, que comprende una etapa en la cual el virus sembrado y/o la vacuna y/o el cultivo es ensayado para determinar la presencia de un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha línea de células, pero que no se desarrolla en huevos de gallina embrionados, en el que dicho agente infeccioso es uno o más de los patógenos siguientes: *Pneumovirinae*; Metaneumovirus de la familia *Paramyxovirinae*; *Rubalavirus* de la familia *Paramyxoviridae*; *Coronaviridae*; *Rhinovirus* de la familia *Picornaviridae*; virus de Varicella Zoster; virus de polioma BK, virus de polioma JC; virus ECHO; virus Coxsackie de los Enterovirus de la familia *Picornaviridae*; Rotavirus; Picornavirus porcino; Parvovirus; Circovirus; bacterias *Chlamydia*; *Reoviridae* de mamíferos.

55 El inventor ha identificado igualmente agentes infecciosos que se desarrollan en algunos sustratos de células usados para la producción de vacuna de influenza pero no se desarrollan en otros. De acuerdo con ello, estos agentes infecciosos son un riesgo de contaminación únicamente para ciertas vacunas de influenza.

La línea de células de mamífero

Las vacunas de influenza de la invención se desarrollan en líneas de células de mamífero, mejor que las que han sido desarrolladas en huevos embrionados. Las líneas de células para el desarrollo de virus de influenza son células Vero [6-8], obtenidas a partir de riñón del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*).

5 Estas líneas de células se encuentran ampliamente disponibles, por ejemplo, de la colección del American Type Cell Culture (ATCC) [10], o del Coriell Cell Repositories [11]. Por ejemplo, la ATCC suministra diversas células Vero diferentes bajo los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587.

Agentes infecciosos que no se desarrollan en huevos de gallina embrionados

10 El inventor ha identificado una variedad de patógenos que pueden desarrollarse en líneas de células de mamífero (en particular, tanto en células MDCK como en células Vero) usadas para la preparación de virus de influenza para la producción de vacunas, pero que no se desarrollan en huevos de gallina. El ensayo para contaminación por estos patógenos no fue necesario para vacunas preparadas sobre el sustrato de huevo tradicional, pero el inventor ha comprobado que el control de calidad de las vacunas debería incluir ensayos para uno o más de estos patógenos con el fin de asegurar las normas de seguridad más exigentes. Los patógenos son los siguientes:

- 15 ■ *Pneumovirinae*, tales como los del género *Pneumovirus*, incluyendo el virus sincitial respiratorio (RSV).
- *Morbilivirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tal como virus del sarampión.
- *Enterovirus* de la familia *Picornaviridae*, tal como el virus Coxsackie, virus ECHO y enterovirus, aunque algunos virus Coxsackie (por ejemplo, B3, B4) se ha encontrado que no se desarrollan en células MDCK.
- 20 ■ *Reoviridae* de mamífero, en particular ortoreovirus (por ejemplo, reovirus de mamífero) y rotavirus. Los reovirus pueden mostrar desarrollo no restringido en células Vero y MDCK, y en consecuencia, el ensayo de los mismos es de particular importancia. Los rotavirus comparten las exigencias de proteasa de los virus de influenza con el fin de desarrollarse en cultivo de células, y este paralelismo podría dar lugar de manera inconsciente a la activación de rotavirus contaminantes.

25 En los casos en que estos patógenos tienen cepas diferentes que tienen huéspedes diferentes (por ejemplo, RSV humano y RSV bovino), el ensayo incumbirá típicamente a cepa(s) que puedan infectar a humanos.

El ensayo para estos agentes es particularmente importante para cepas víricas obtenidas a partir de técnicas genéticas inversas, ya que los virus sembrados para la fabricación de virus experimentarán múltiples pases en el cultivo de células de mamífero durante los procedimientos genéticos inversos, incrementándose, con ello, el riesgo de contaminación por agentes infecciosos accidentales.

30 Agentes infecciosos que no se desarrollan en huevos, pero que se desarrollan en diferentes líneas de células de mamífero

El inventor ha identificado una variedad de patógenos que no se desarrollan en huevos de gallina, que no se desarrollan en células MDCK, pero que se desarrollan en células Vero. El ensayo para contaminación por estos patógenos no fue necesario para vacunas preparadas sobre el sustrato de huevo tradicional y no es necesario para vacunas preparadas sobre células MDCK, pero el inventor ha comprobado que el control de calidad de las vacunas desarrolladas sobre células Vero debería incluir ensayos para uno o más de estos patógenos con el fin de asegurar las normas de seguridad más exigentes. Los patógenos son los siguientes:

- 35 ■ *Metaneumovirus*, de la familia *Paramyxoviridae*, tal como metaneumovirus humano (HMPV).
- *Rubalavirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tal como virus de las paperas, el cual se desarrolla en Vero.
- 40 ■ *Togaviridae*, tal como *Rubellavirus*.
- *Coronaviridae*, tal como el coronavirus SARS y otros coronavirus humanos. Estos virus muestran altas proporciones de desarrollo en células Vero, mostrando el virus SARS desarrollo no restringido, y en consecuencia, el ensayo para ellos es de particular importancia.
- *Rhinovirus* de la familia *Picornaviridae*, tales como las cepas M de Rhinovirus.
- 45 ■ Virus de varicella Zoster (VZV), también conocido como virus 2 de herpes humano (HHV3). El VZV puede mostrar desarrollo no restringido en células Vero y, en consecuencia, su ensayo es de particular importancia.
- *Polyomaviridae*, tales como virus de poliooma SV-40, el virus de poliooma BK, y el virus de poliooma JC. Estos virus de poliooma pueden mostrar desarrollo no restringido en células Vero (en particular, en células BK) y, en consecuencia, su ensayo es de particular importancia.
- 50 ■ *Circovirus* porcino.

- Picornavirus porcino, tales como virus de la enfermedad vesicular porcina (SVDV) y virus Teschen-Talfan.

- Bacterias *Chlamydia*, incluyendo *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* y *C. psittaci*. Estas bacterias pueden desarrollarse en células Vero y, en consecuencia, su ensayo es de particular importancia.

- Parvovirus, tales como parvovirus canino (CPV) o parvovirus porcino.

5 En los casos en que estos patógenos tienen cepas diferentes que tienen huéspedes diferentes (por ejemplo, RSV humano y RSV bovino), el ensayo incumbirá típicamente a cepa(s) que puedan infectar a humanos.

10 El ensayo para virus no humanos (por ejemplo, virus aviar y porcino) es particularmente importante únicamente cuando los materiales aviares o porcinos se han usado en la preparación vírica, por ejemplo, si las cepas fueron inicialmente aisladas a partir de cerdos o aves, o si se usaron pases de huevos durante el desarrollo inicial, o si se usó tripsina de porcino en el cultivo de células, etc.

Agentes infecciosos que se desarrollan en huevos y en líneas de células de mamífero

15 El inventor ha identificado igualmente patógenos que, en contraste con los descritos anteriormente, se desarrollan tanto en líneas de células de mamífero como en huevos de gallina. Un procedimiento de la presente invención puede implicar una etapa de ensayo de dichos patógenos, pero esta etapa formaría igualmente parte del control de calidad potenciado de virus desarrollados en huevos de gallina. Estos patógenos incluyen:

- Virus de parainfluenza (PIV), miembros de los *Paramyxoviridae paramyxovirinae*, incluyendo PIV-1, PIV-2 y PIV-3.

- Los *Herpesviridae*, tales como el virus simplex del herpes 1 y 2.

- Los *Adenoviridae*, tales como los adenovirus, incluyendo el adenovirus humano y simio.

20 ■ *Mycoplasma*.

- Adenovirus aviar.

- *Reoviridae* aviar, en particular ortoreovirus, tales como reovirus aviar que pueden desarrollarse en líneas de células de mamífero.

25 El inventor ha identificado igualmente patógenos que se desarrollan en huevos de gallina y en células Vero, pero no se desarrollan o es improbable que lo hagan en células MDCK. Un procedimiento de la invención puede implicar una etapa de ensayo para dichos patógenos, pero esta etapa debería igualmente ser parte del control de calidad potenciado de virus desarrollados en huevos de gallina, y la etapa no es necesaria si se usa un substrato MDCK. Estos patógenos incluyen:

- *Birnaviridae*, tales como virus de la enfermedad bursal infecciosa (también conocido como virus de gumboro).

30 El ensayo para agentes que se desarrollan tanto en huevos como en líneas de células es importante para las cepas víricas obtenidas después de pases múltiples en huevos, por ejemplo, virus sembrados para la fabricación de virus.

Procedimientos de ensayo

35 Los procedimientos para la detección de la presencia de patógenos en cultivos de células en productos biofarmacéuticos se encuentran disponibles de manera rutinaria. Generalmente, los procedimientos se basan en la detección inmuno-química (inmunoensayo, transferencia de Western, ELISA, etc.) y/o la detección de ácido nucleico (procedimientos de hibridación, tal como transferencias de Southern o transferencias de muescas, PCR, etc.). Como una alternativa, es posible ensayar la presencia de un patógeno mediante inoculación convencional de cultivo de células (es decir, ensayo de si el material conduce a la producción del patógeno contaminante cuando se cultiva bajo condiciones adecuadas).

40 Los procedimientos pueden detectar un único patógeno (por ejemplo, virus) o pueden detectar múltiples patógenos (por ejemplo, varios virus). Cuando un ensayo detecta múltiples patógenos (por ejemplo, "X", "Y" o "Z"), en ese caso, puede dar un resultado específico (por ejemplo, el virus "Y" está presente) o puede dar un resultado general (por ejemplo, está presente uno de "X", "Y" o "Z"). Los procedimientos pueden ser cuantitativos, semi-cuantitativos o cualitativos. Pueden usarse procedimientos de detección en tiempo real. La guía general para la detección de un patógeno (por ejemplo, virus) de interés puede encontrarse en la referencia 14. En el siguiente párrafo, se muestran un cierto número de ensayos más específicos, y las personas expertas pueden encontrar o preparar fácilmente un ensayo para la detección de la presencia de cualquier patógeno elegido.

50 La referencia 15 divulga un ensayo PCR de transcripción inversa múltiple (RT-PCR), referida como "m-RT-PCR-ELISA", para la detección de nueve patógenos del tracto respiratorio en un único ensayo, fundamentalmente:

enterovirus, virus de influenza tipo A y tipo B, virus sincitial respiratorio, virus de parainfluenza Tipo 1 y Tipo 3, adenovirus, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamidia pneumoniae*. En la referencia 16 se divulga un procedimiento RT-PCR para la detección de reovirus de mamífero. La referencia 17 divulga un ensayo RT-PCR en tiempo real para la detección de metaneumovirus humano procedente de todos los linajes genéticos conocidos. La referencia 18 divulga un único ensayo RT-PCR para la detección del virus sincitial respiratorio humano (HRSV), virus de parainfluenza humano 1, 2, y 3 e influenza A y B. La referencia 19 divulga un ensayo múltiplex RT-PCR para detectar y diferenciar el virus del sarampión, virus de la rubéola, y parvovirus B19. En la referencia 20 se divulga un ensayo RT-PCR en tiempo real para detectar rinovirus humano con discriminación exacta de otros virus procedentes de la familia *Picornaviridae*. La referencia 21 divulga un ensayo RT-PCR múltiplex con conjuntos de cebador anidados dirigidos a regiones conservadas de hemaglutinina de virus de parainfluenza humano, proteína inoculada de coronavirus humano, y genes de poliproteína de enterovirus y rinovirus humanos, que permite la detección y determinación del tipo de manera rápida, sensible, y simultánea de los cuatro tipos de virus de parainfluenza (1, 2, 3, 4AB), coronavirus humano 229E y OC43, y la detección genérica de enterovirus y rinovirus. En la referencia 22 se divulga la detección de SVDV mediante RT-PCR. En la referencia 23 se divulga un ensayo RT-PCR cuantitativo de una sola etapa para el coronavirus SARS. La referencia 24 divulga un ensayo PCR en tiempo real de discriminación de alélico TaqMan para VZV. En la referencia 25 se divulga un ensayo PCR múltiplex para la detección simultánea y rápida de virus de pseudorrabia, parvovirus y circovirus. En la referencia 26 se describe un ensayo PCR de sonda FRET en tiempo real para la detección del virus de polioma SV-40. En la referencia 27 se divulga un ensayo para la detección y diferenciación simultánea de virus de polioma humano JC y BK mediante un procedimiento PCR-ELAHA rápido y sensible. En la referencia 28 se divulga la detección de circovirus pocino en líneas de células humanas mediante PCR y ensayos de inmunofluorescencia indirecta. En las referencias 29 y 30 se divulgan procedimientos PCR para la detección de birnavirus.

El procedimiento de detección de la invención puede llevarse a cabo en cualquier fase(s) durante la fabricación de la vacuna, a partir del virus sembrado y/o el sustrato de células y/o el medio de cultivo, a través de las fases de infección vírica y de desarrollo, a través de la recolección vírica, a través de cualquier tratamiento vírico (por ejemplo, desdoblamiento y/o extracción de proteína de superficie), a través de la formulación de la vacuna y, finalmente, el envasado de la vacuna. De acuerdo con ello, el ensayo usado de acuerdo con la invención puede llevarse a cabo sobre los materiales usados para crear el cultivo vírico, sobre el propio cultivo vírico, y sobre el material extraído y obtenido a partir del cultivo vírico. El ensayo no necesita llevarse a cabo sobre todas y cada una de las vacunas o cultivos, pero puede usarse a intervalos apropiados como parte del control de calidad normal. Es particularmente útil cuando la producción de vacuna se cambia para las nuevas cepas anualmente recomendadas por las autoridades reguladoras, en cuya fase se establecen nuevos cultivos y deben ser sometidos a nuevo control de calidad. Los ensayos de la invención se llevan a cabo de manera ventajosa sobre virus sembrados usados para la fabricación de vacunas.

En los procedimientos de la invención, las líneas de células usadas para desarrollar virus de influenza pueden cultivarse en cualquier medio adecuado, por ejemplo, en medios libres de suero, en medios libres de proteína, etc. En la referencia 2 se divulgan procedimientos para el cultivo libre de suero de virus de influenza, y en la referencia 31 se divulgan procedimientos para el cultivo libre de proteína. No obstante, un medio "libre de proteína" puede incluir una o más proteasas (por ejemplo, tripsina) que pueden ser necesarias para la propagación del virus de influenza. Un medio libre de suero puede incluir suplementos de suero.

Es igualmente preferido que la vacuna se hubiera desarrollado en un cultivo si la adición de material obtenido a partir de bovinos, asegurando, de esta forma, que el cultivo está libre de cualquier contaminación posible de BSE y de virus bovinos. Los medios que no incluyen componentes asociados con ninguna encefalopatía espongiiforme transmisible son los preferidos.

La vacuna de influenza

La presente invención se refiere al control de calidad de vacunas de influenza. La vacuna puede estar en la forma de un virus vivo o, preferiblemente, un virus inactivado. Típicamente, los virus inactivados implican tratamiento con un producto químico tal como formalina o β -propiolactona. En los casos en que se usa un virus inactivado, la vacuna puede ser un virus completo, un virus desdoblado, o subunidades víricas. Los virus desdoblados se obtienen mediante el tratamiento de viriones con detergentes (por ejemplo, éter etílico, polisorbato 80, desoxicolato, fosfato de tri-N-butilo, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetiltrimetilamonio, etc.) para producir preparaciones de subviriones. Las vacunas subunidad comprende los antígenos de superficie de influenza hemaglutinina y neuraminidasa. Los antígenos de influenza pueden estar presentes igualmente en la forma de virisomas [32].

Las vacunas de la invención pueden estar basadas en cualquier cepa(s) adecuada. Típicamente, las vacunas incluyen antígenos de al menos una cepa de virus de influenza A y/o al menos una cepa de virus de influenza B. Las cepas recomendadas para vacunas cambian de temporada en temporada. En el período inter-pandémico actual, típicamente, las vacunas incluyen dos cepas de influenza A (H1N1 y H3N2) y una influyente. La cepa B y las vacunas trivalentes son las preferidas. Igualmente, la invención es adecuada para la preparación de virus a partir de cepas pandémicas, tales como las cepas H5 o H7, es decir cepas a las cuales la población humana es inmunológicamente inocente. Las vacunas en situaciones pandémicas pueden ser monovalentes, o pueden estar basadas en una vacuna trivalente normal suplementada con una cepa pandémica.

El virus o tipos de virus influenza usados en los procedimientos de la invención pueden ser cepas reordenadas, y/o pueden haberse obtenido mediante técnicas genéticas inversas. El virus o tipos de virus pueden estar atenuados. El virus o tipos de virus pueden ser sensibles a la temperatura. El virus o tipos de virus pueden estar adaptados al frío.

En los casos en que una vacuna incluye más de una cepa de influenza, típicamente, las diferentes cepas se desarrollan por separado y se mezclan después de que los virus se han recolectado y se han preparado los antígenos. De acuerdo con ello, los procedimientos de la invención pueden incluir la etapa de mezclado de antígenos a partir de más de una cepa de influenza. El ensayo para patógenos puede llevarse a cabo antes o después de dicho mezclado.

Típicamente, la vacuna se preparará para administración a un paciente mediante inyección (por ejemplo, inyección subcutánea o inyección intramuscular), aunque se conocen otras vías de administración para vacunas de influenza, por ejemplo, intranasal [33-35], oral [36], intradérmica [37,38], transcutánea, transdérmica [39], etc.

Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como a adultos. Las vacunas de influenza se recomiendan actualmente para uso en inmunización pediátrica y de adultos, a partir de la edad de 6 meses. Las exigencias de seguridad son las más agudas para las vacunas pediátricas, particularmente dado que los sujetos inmunológicamente inocentes reciben, típicamente, dos dosis de vacunas en un corto período de tiempo (por ejemplo, con 1 a 2 meses de intervalo).

Las vacunas de la invención pueden incluir un adyuvante. Los adyuvantes que se han usado en vacunas de influenza incluyen sales de aluminio [40,41], quitosano [42], oligodesoxinucleótidos CpG tal como CpG 7909 [43], emulsiones de aceite en agua tal como MF59 [44], emulsiones de agua en aceite [45], toxina lábil térmicamente de *E. coli* [34,46] y sus mutantes destoxificados [47-48], lípido monofosforilo A [49] y su derivado 3-o-desacetilado [50], mutantes de toxina pertussis [51], dipéptidos muramilo [52], etc.

La hemaglutinina (HA) es el inmunógeno principal en vacunas de influenza inactivadas, y las dosis de vacuna están normalizadas con referencia a niveles de HA, típicamente medidos mediante un ensayo de inmunodifusión radial único (SRID). Típicamente, las vacunas contienen aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque también se usan dosis más bajas, por ejemplo, para niños, o en situaciones pandémicas. Se han usado dosis fraccionadas tales como de ½ (es decir, 7,5 µg de HA por cepa), ¼ y ⅙ [40,53]. De acuerdo con ello, las vacunas pueden incluir entre 1 y 20 µg de HA por cepa de influenza, preferiblemente, por ejemplo, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 1,9, etc.

Las vacunas pueden incluir conservantes tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, se prefiere que la vacuna estuviera substancialmente libre de materia mercurial (es decir, menos de 5 µg/ml), por ejemplo, libre de tiomersal [54,55]. Las vacunas que no contienen mercurio son más preferidas.

Preferiblemente, las vacunas de la invención contienen menos de 10 ng (preferiblemente menos de 1 ng, y más preferiblemente menos de 100 pg) de ADN de célula huésped residual por dosis, aunque pueden estar presentes cantidades trazas de ADN de célula huésped. El ADN contaminante puede eliminarse durante la preparación de la vacuna usando procedimientos de purificación convencionales, por ejemplo, cromatografía, etc. La eliminación del ADN de la célula huésped residual puede potenciarse mediante tratamiento con nucleasa, por ejemplo, mediante el uso de Benzonase® DNase [1]. Las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de célula huésped por 15 µg de hemaglutinina son las preferidas, al igual que lo son las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de célula huésped por 0,25 ml de volumen. Las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de célula huésped por 50 µg de hemaglutinina son más preferidas, al igual que lo son las vacunas que contienen <10 ng (por ejemplo, <1 ng, <100 pg) de ADN de célula huésped por 0,5 ml de volumen.

Estas diversas características de las vacunas pueden lograrse incluyendo etapas adecuadas en los procedimientos de la invención. Así, las etapas específicas incluyen: una etapa de inactivación; una etapa de mezclado de tres cepas de virus para obtener una vacuna trivalente; una etapa de formulación de la vacuna para inyección; una etapa de administración de la vacuna a un paciente; una etapa de combinación de la vacuna con el adyuvante; una etapa de medición del contenido en HA; una etapa de ajuste del contenido en HA, por ejemplo, por dilución; una etapa de adición de un conservante; una etapa de eliminación de los ácidos nucleicos de la célula huésped residuales; etc.

Agentes accidentales preferidos para ensayo

Las realizaciones preferidas de la invención implican agentes accidentales, y particularmente virus, que se han encontrado en muestras respiratorias, ya que estos son más probables que se encuentren presentes en aislados clínicos iniciales de virus de influenza. Los patógenos respiratorios incluyen: RSV, PIV-3, coronavirus SARS, adenovirus, rinovirus, reovirus ("virus huérfano entérico respiratorio"), etc. El virus de herpes simplex puede igualmente encontrarse en muestras respiratorias.

Los patógenos particularmente preferidos para los cuales la invención se usa son: reovirus (particularmente reovirus de mamífero); virus de polioma; birnavirus; circovirus; y parvovirus. El ensayo para los virus de herpes simplex es también preferido.

En los casos en que una vacuna ha sido tratada con detergente (por ejemplo, un desdoblamiento o una vacuna

subunidad), en ese caso, esta etapa de tratamiento ofrece un grado de seguridad extra, puesto que este puede también interrumpir los virus contaminantes. Sin embargo, si el contaminante no se ha desarrollado, en ese caso, el tratamiento con detergente usualmente no tendrá efecto sobre la vacuna y, por tanto, no mejora por sí mismo la seguridad. En consecuencia, el ensayo para los patógenos siguientes es particularmente importante, ya que no se han desarrollado:

5 *Picornaviridae*, *Birnaviridae*, *Parvoviridae*, *Circoviridae*, *Adenoviridae*, *Polyomaviridae*.

La resistencia a detergentes de estos virus combinada con su alto desarrollo en células vero indica que es particularmente importante el ensayo para enterovirus humanos, los *Reoviridae* humanos, los *Adenoviridae* y los *Polyomaviridae* cuando se usa un sustrato de células Vero. Igualmente, los *Reoviridae* de mamíferos se desarrollan a altas proporciones en células MDCK. Estos virus se encuentran igualmente entre los más resistentes a la inactivación.

10 El ensayo para determinar la presencia de *Reoviridae* de mamíferos es una realización preferida de la invención, puesto que: (a) los virus no se desarrollan fácilmente en huevos de gallina y, en consecuencia, el ensayo para ellos no ha formado parte de la fabricación del virus de influenza tradicional; (b) los virus pueden mostrar desarrollo no restringido tanto en líneas de células MDCK como Vero; (c) los virus son altamente resistentes a la inactivación y permanecen estables durante el tratamiento de la vacuna; (d) los virus no están desarrollados y, por ello, pueden sobrevivir al tratamiento con detergente del virus de influenza; y (e) los virus están implicados en las infecciones respiratorias y, por ello, podrían contaminar aislados víricos iniciales.. El ensayo para determinar *Reoviridae* aviar es igualmente importante en los casos en que se han usado materiales aviares durante la preparación del virus, y los criterios (b) a (e) enumerados anteriormente son de aplicación igualmente a retrovirus aviares.

Generalidades

20 El término “comprende” abarca “incluye”, así como “constituido”, por ejemplo, una composición que “comprende” X puede estar constituida exclusivamente por X o puede incluir algo adicional, por ejemplo, X + Y.

El término “aproximadamente” en relación a un valor numérico x, significa, por ejemplo, $x \pm 10\%$.

25 La palabra “substancialmente” no excluye “completamente”, por ejemplo, una composición que está “substancialmente libre” de Y puede estar completamente libre de Y. En casos necesarios, la palabra “substancialmente” puede omitirse de la definición de la invención.

En los capítulos 17 y 18 de la referencia 57 puede encontrarse información general adicional sobre vacunas de influenza, incluyendo cepas, líneas de células para desarrollo, dosis, combinaciones, formulaciones, etc. En el capítulo 46 de la referencia 14 pueden encontrarse detalles adicionales sobre virus influenza, incluyendo detalles de su ciclo de vida durante el desarrollo vírico.

30 MODOS PARA LLEVAR A CABO LA INVENCION

Células MDCK (Ejemplo de referencia)

35 El inventor tiene amplia experiencia del desarrollo de virus de influenza sobre células MDCK en cultivo libre de suero para la preparación de vacunas. El autor ha comprobado que las células son también huéspedes adecuados para otros agentes patógenos y, por tanto, se ha ensayado la capacidad de otros diversos patógenos para desarrollarse en las mismas condiciones (específicamente, cultivo de MDCK 33016, depositado como DSM ACC2219, en medio libre de suero, tal como se divulga en la referencia 2).

40 Cuando se ensaya para determinar la replicación de virus activo o el desarrollo en células MDCK, los ensayos para los virus sincitiales respiratorios RSV-A2 y RSV-B fueron negativos. Se detectaron cepas de virus de parainfluenza PI-3 y SV-5. Los ensayos para coronavirus humano 229E y SARS fueron negativos, así como lo fueron los ensayos para virus de polio I, virus ECHO 6, virus coxsackie A16 y virus coxsackie B3. Los ensayos de rinovirus Tipo Ib, 37 y NL.9501841 fueron negativos. Los ensayos para reovirus Reo3 fueron positivos, así como lo fueron los ensayos para el virus del herpes simplex HSV-1. Los ensayos para adenovirus humano 1, 5 y 6 fueron negativos. Los ensayos de SV-40 fueron negativos, y los títulos de inóculo se mantuvieron estables durante 14 días. Los ensayos de parvovirus canino y de virus menudo de ratones fueron negativos, al igual que lo fue el virus del sarcoma de Rous. El ensayo de *Mycoplasma hyorhinis* fue negativo. El ensayo de *Chlamydia trachomatis* fue negativo, aunque no puede excluirse una proporción muy pequeña de desarrollo durante los días 3-5 después de la infección.

45 La investigación adicional reveló que las células MDCK pueden soportar el desarrollo del virus de estomatitis vesicular (Indiana), virus vaccinia, virus coxsackie B5; reovirus 2; adenovirus humano tipos 4 y 5; exantema vesicular de virus porcino, y virus de la hepatitis canina infecciosa [58].

50 De entre los virus que podrían desarrollarse en células MDCK, los virus de parainfluenza, virus del herpes simplex y adenovirus pueden desarrollarse igualmente en huevos de gallina embrionados. Por el contrario, los reovirus humanos (y reovirus de otros mamíferos) no se desarrollan fácilmente en huevos. Si se usa MDCK como un sistema de cultivo de células para la producción de virus de influenza, en ese caso, el ensayo de control de calidad debería comprobar la contaminación por reovirus humano. El inventor estima que las proporciones de reovirus podrían incrementarse en 5 logs o más durante pases repetidos en cultivos de suspensión de MDCK, en tanto que las

proporciones de un virus tal como adenovirus disminuirían en 6 a 10 logs. Las proporciones de virus de herpes simplex deberían igualmente comprobarse, ya que es posible el desarrollo de HSV en al menos 8 logs. De manera similar, se ha observado el desarrollo de PIV-3 en 8 logs después de 1 semana de cultivo.

Células Vero

5 Después de los trabajos de ensayo sobre células MDCK, se investigó la replicación de patógenos en células Vero. Las células Vero sirven de soporte para el desarrollo de patógenos tales como: neumovirus, tales como RSV-A y RSV-B; metaneumovirus humano (HMPV); morbilivirus, tales como virus del sarampión; paramixovirus, tales como virus de parotiditis y virus de parainfluenza; virus de la rubéola; coronavirus humano y aviar; picornavirus, tales como enterovirus, virus ECHO y virus coxsackie, y virus SVDV y Teschen-Talfan porcinos; reovirus de mamífero y aviar; virus del herpes, tales como HSV-1 y HSV-2; adenovirus símico y humano; virus zoster de varicela (VZV); virus de polioma, tales como JC, BK y SV-40; birnavirus, tal como gumbobovirus; circovirus porcino; parvovirus canino; y *Chlamydia*.

10 De entre estos patógenos, los siguientes no se desarrollan en huevos de gallina y, por ello, existen nuevos riesgos de contaminación de vacunas de influenza cuando se usan células Vero como un substrato: RSV; HMPV; virus del sarampión; virus de la rubéola; coronavirus humanos; enterovirus; reovirus; VZV; virus de polioma; picornavirus porcinos; parvovirus y circovirus. Muchos de estos patógenos no se desarrollan en células MDCK, lo que muestra que MDCK es un substrato más seguro para la producción de vacuna de influenza. Los virus emergentes tales como coronavirus SARS se desarrollan sobre células Vero, pero no sobre células MDCK. De manera similar, VZV se desarrolla sobre células Vero, pero no sobre huevos de gallina o sobre células MDCK. La vacunación con una vacuna de influenza obtenida a partir de Vero que ha sido contaminada inadvertidamente con este coronavirus o con VZV podría dar lugar a un brote yatrógeno de SARS y/o varicela, lo cual sería desastroso tanto para la población como para la reputación de las vacunas. Sin embargo, habiendo identificado estos riesgos pueden ponerse establecerse los mecanismos de control de calidad apropiados.

15 Además de las células Vero, las células PER.C6 soportan el desarrollo de adenovirus [59,60]. En base a características víricas conocidas, puede esperarse también que las células PER.C6 soporten el desarrollo de al menos virus de parainfluenza y de reovirus.

20 Se da por entendido que la invención se ha descrito anteriormente a modo de ejemplo únicamente y que pueden hacerse modificaciones manteniéndose dentro del ámbito de la invención.

REFERENCIAS

- [1] Patente de EE.UU. 5.948.410.
- 30 [2] Patente WO 97/37000.
- [3] Brands y otros, Dev. Biol. Stand., vol. 98, págs. 93-100, (1999).
- [4] Halperin y otros, Vaccine, vol. 20, págs. 1240-7, (2002).
- [5] Tree y otros, Vaccine, vol. 19, págs. 3444-50, (2001).
- [6] Kistner y otros, Vaccine, vol. 16, págs. 960-8, (1998).
- 35 [7] Kistner y otros, Dev. Biol. Stand., vol. 98, págs. 101-110, (1999).
- [8] Bruhl y otros, Vaccine, vol. 19, págs. 1149-58, (2000).
- [9] Pau y otros, Vaccine, vol. 19, págs. 2716-21, (2001).
- [10] <http://www.atcc.org/>
- [11] <http://locus.umdj.edu/>
- 40 [12] Patente WO 03/076601.
- [13] Patente WO 2005/042728.
- [14] Knipe & Howley Fields Virology (4th edition, 2001), ISBN 0-7817-1832-5.
- [15] Puppe y otros, J. Clin. Virol., vol. 30, págs. 165-74, (2004).
- [16] Leary y otros, J. Clin. Microbiol., vol. 40, págs. 1368-75, (2002).
- 45 [17] Maertzdorf y otros, J. Clin. Microbiol., vol. 42, págs. 981-6, (2004).
- [18] Erdman y otros, J. Clin. Microbiol., vol. 41, págs. 4298-303, (2003).

- [19] Mosquera Mdel y otros, J. Clin. Microbiol., vol. 40, págs. 111-6, (2002).
- [20] Deffernez y otros, J. Clin. Microbiol., vol. 42, págs. 3212-3218, (2004).
- [21] Coiras y otros, J. Med. Virol., vol. 72, págs. 484-95, (2004).
- [22] Reid y otros, J. Virol. Methods, vol. 116, págs. 169-76, (2004).
- 5 [23] Poon y otros, J. Clin. Virol., vol. 30, págs. 214-7, (2004).
- [24] Campsall y otros, J. Clin. Microbiol., vol. 42, págs. 1409-13, (2004).
- [25] Huang y otros, Vet. Microbiol., vol. 101, págs. 209-14, (2004).
- [26] Mayall y otros, J. Clin. Pathol., vol. 56, págs. 728-30, (2003).
- [27] Whiley y otros, J. Med. Virol., vol. 72, págs. 467-72, (2004).
- 10 [28] Hattermann y otros, Xenotransplantation, vol. 11, págs. 284-94, (2004).
- [29] Novoa y otros, Vet. Res., vol. 26, págs. 493-8, (1995).
- [30] Blake y otros, J. Clin. Microbiol., vol. 33, págs. 835-9, (1995).
- [31] Patente WO 96/15231.
- [32] Huckriede y otros, Methods Enzimol., vol. 373, págs. 74-91, (2003).
- 15 [33] Greenbaum y otros, Vaccine, vol. 22, págs. 2566-77, (2004).
- [34] Zurbriggen y otros, Expert. Rev. Vaccines, vol. 2, págs. 295-304, (2003).
- [35] Piascik y otros, J. Am. Pharm. Assoc. Wash DC, vol. 43, págs. 728-30, (2003).
- [36] Mann y otros, Vaccine, vol. 22, págs. 2425-9, (2004).
- [37] Halperin y otros, Am. J. Public. Health, vol. 69, págs. 1247-50, (1979).
- 20 [38] Herbert y otros, J. Infect. Dis., vol. 140, págs. 234-8, (1979).
- [39] Chen y otros, Vaccine, vol. 21, págs. 2830-6, (2003).
- [40] Hehme y otros, Virus Res., vol. 103, págs. 163-71, (2004).
- [41] Patente de EE.UU. 6.372.223.
- [42] Patente de EE.UU. 6.534.065.
- 25 [43] Cooper y otros, Vaccine, vol. 22, págs. 3136-43, (2004).
- [44] Frey y otros, Vaccine, vol. 21, págs. 4234-7, (2003).
- [45] Bozkir & Hayta, Drug Target, vol. 12, págs. 157-64, (2004).
- [46] Guebre-Xabier y otros, J. Virol., vol. 77, págs. 5218-25, (2003).
- [47] Peppoloni y otros, Expert. Rev. Vaccines, vol. 2, págs. 285-93, (2003).
- 30 [48] Pine y otros, J. Control Release, vol. 85, págs. 263-70, (2002).
- [49] Baldrige y otros, Vaccine, vol. 18, págs. 2416-25, (2000).
- [50] Patente WO 94/19013.
- [51] Documento EP-A-0721782.
- [52] Patente de EE.UU. 5.292.506.
- 35 [53] Patente WO 01/22992.
- [54] Banzhoff, Immunology Letters, vol. 71, págs. 91-96, (2000).
- [55] Patente WO 02/097072.

- [56] Adamson, Dev. Biol. Stand., vol. 93, págs. 89-96, (1998).
- [57] Vaccines, (eds. Plotkin & Orenstein) 4th edition, (2004), ISBN 0-7216-9688-0.
- [58] ATCC catalog information for MDCK (CCL 34).
- [59] Goossens y otros, Arthritis Rheum., vol. 44, págs. 570-7, (2001).
- 5 [60] Fallaux y otros, Hum. Gene Ther., vol. 9, págs. 1909-17, (1998).

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la preparación de una vacuna de influenza a partir de virus de influenza que se desarrolla en un cultivo de una línea de células Vero, que comprende una etapa en la cual el virus sembrado y/o la vacuna y/o el cultivo se ensaya para determinar la presencia de un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha línea de células, pero que no se desarrolla en huevos de gallina embrionados, en el que dicho agente infeccioso es uno o más de los patógenos siguientes: *Pneumovirinae*; Metaneumovirus de la familia *Paramyxovirinae*; *Rubalavirus* de la familia *Paramyxoviridae*; *Coronaviridae*; *Rhinovirus* de la familia *Picornaviridae*; virus de Varicella Zoster; virus de polioma BK, virus de polioma JC; virus ECHO; virus Coxsackie de los Enterovirus de la familia *Picornaviridae*; Rotavirus; Picornavirus porcino; Parvovirus; Circovirus; bacterias *Chlamydia*; *Reoviridae* de mamíferos.
- 10 2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que el agente infeccioso es uno o más de los patógenos siguientes: metaneumovirus humano (HMPV); virus de la parotiditis; virus sincitial respiratorio (RSV); coronavirus humano; coronavirus SARS; cepas M de Rinovirus; virus vesicular porcino (SVDV); Parovirus canino; virus Teschen-Talfan; *C. trachomatis*; *C. pneumoniae*; *C. psittaci*.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además una o más de las etapas siguientes: una etapa de inactivación; una etapa de mezclado de tres cepas de virus para obtener una vacuna trivalente; una etapa de formulación de la vacuna para inyección; una etapa de combinación de la vacuna con un adyuvante; una etapa de medición del contenido en HA; una etapa de ajuste del contenido en HA, por ejemplo, por dilución; una etapa de adición de un conservante; una etapa de eliminación de los ácidos nucleicos de la célula huésped residuales.
- 20 4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cultivo se ensaya mediante detección inmunológica; ensayos de inoculación de cultivos de células y/o detección de acción nucleico.
5. El procedimiento de la reivindicación 4, en el que la detección es mediante ELISA y/o PCR.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el ensayo se lleva a cabo en una de las fases siguientes: infección vírica, fases de desarrollo, recolección vírica, tratamiento vírico, desdoblamiento, extracción de proteína de superficie, formulación de vacuna, envasado de vacuna.