



19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 359 214**

51 Int. Cl.:  
**A61K 39/13** (2006.01)  
**A61K 39/145** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **06831855 .9**  
96 Fecha de presentación : **01.11.2006**  
97 Número de publicación de la solicitud: **1951296**  
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.08.2008**

54 Título: **Vacunas virales derivadas de células con niveles reducidos de ADN celular residual.**

30 Prioridad: **01.11.2005 US 732786 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:  
**19.05.2011**

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:  
**19.05.2011**

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

72 Inventor/es: **Gregersen, Jens-Peter y**  
**Kost, Holger**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 359 214 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

Vacunas virales derivadas de células con niveles reducidos de adn celular residual

**Campo técnico**

5 La presente invención proporciona procedimientos que dan como resultado productos y procedimientos de cultivos celulares mejorados con impurezas reducidas. Específicamente, la presente invención proporciona un procedimiento mejorado para degradar cualquier ADN de cultivo celular funcional residual que permanece asociado con el producto generado en el cultivo celular. De acuerdo con la invención, el ADN de cultivo celular funcional residual se degrada por tratamiento con un agente alquilante de ADN, tal como  $\beta$ -propiolactona (BPL). Este proceso puede usarse para tratar una diversidad de productos de cultivos celulares que incluyen vacunas y proteínas recombinantes.

**Antecedentes de la técnica**

15 La producción comercial de vacunas virales requiere típicamente grandes cantidades de virus como fuente de antígeno. Las cantidades comerciales de virus para la producción de vacunas pueden conseguirse por cultivo y replicación de un virus de semilla en un sistema de cultivo celular. Los sistemas de cultivo celulares adecuados para la replicación viral incluyen células de mamíferos, de aves o de insectos, prefiriéndose particularmente los sistemas de cultivo celulares de mamíferos para las vacunas virales para garantizar la correcta glucosilación y plegamiento de las proteínas antigénicas virales. Por similares razones, también se prefieren los sistemas de cultivo celulares de mamíferos para la expresión de proteínas recombinantes.

20 Si no se modifican de su estado de origen natural, los cultivos celulares tienen una capacidad limitada para reproducirse y por consiguiente son poco prácticos e ineficaces para producir la cantidad de material necesario para una vacuna o proteína recombinante comercial. Por consiguiente, con fines de fabricación, se prefiere que las células se modifiquen para ser líneas celulares "continuas" o "inmortalizadas" para aumentar el número de veces que pueden dividirse. Muchas de estas modificaciones emplean mecanismos similares a los que están implicados en células oncogénicas. Como tal, existe una preocupación de que cualquier material residual de los procesos de cultivo celular, tal como ADN celular del huésped, pueda eliminarse de la formulación final de un producto de vacuna o de proteína recombinante fabricado en estos sistemas.

25 Un modo convencional para eliminar ADN celular residual del huésped es por tratamiento con DNasa. Un procedimiento conveniente de este tipo se desvela en la Patente Europea 0870508 y en la Patente de Estados Unidos 5948410, que implica un tratamiento en dos etapas, usando en primer lugar una DNasa (*por ejemplo*, Benzonasa) y después un detergente catiónico (*por ejemplo* BCTA).

30 Los esfuerzos actuales para reducir este riesgo se han enfocado en reducir la concentración total de ADN celular residual del huésped. Un objeto de la presente invención es reducir el riesgo eliminado adicionalmente la funcionalidad de cualquier ADN que permanezca en la célula huésped.

**Sumario de la invención**

35 La presente invención proporciona procedimientos que dan como resultado productos de cultivos celulares mejorados y procesos con impurezas reducidas. Específicamente, la presente invención proporciona un procedimiento mejorado para degradar cualquier ADN de cultivo celular funcional residual que permanece asociado con el producto generado en el cultivo celular. De acuerdo con la invención, el ADN de cultivo celular funcional residual se degrada por tratamiento con un agente alquilante de ADN, tal como  $\beta$ -propiolactona (BPL). Este proceso puede usarse para tratar una diversidad de productos de cultivos celulares que incluyen vacunas y proteínas recombinantes.

40 La divulgación incluye una vacuna que comprende proteínas inmunogénicas derivadas de un virus propagado en cultivo celular, en el que la vacuna carece sustancialmente de ADN de cultivo celular funcional residual.

45 La funcionalidad de cualquier ADN celular residual del huésped puede eliminarse tratando el ADN con un agente alquilante que escinde el ADN en partes lo suficientemente pequeñas para que no pueda codificar una proteína funcional, se trasponga en un cromosoma humano receptor o de otra manera la maquinaria de replicación del ADN del receptor lo reconozca. Preferentemente, la longitud del ADN de cultivo celular residual degradado es menor de 500 pares de bases. Más preferentemente, la longitud del ADN de cultivo residual degradado es menor de 200 pares de bases.

50

**Descripción detallada**

Los procedimientos de la presente invención proporcionan productos y procesos de cultivo celular mejorados con impurezas reducidas. Específicamente, la presente invención proporciona un procedimiento mejorado para degradar cualquier ADN de cultivo celular funcional residual que permanezca asociado con el producto generado en el cultivo celular. De acuerdo con la invención, el ADN de cultivo celular funcional residual se degrada por tratamiento con un agente alquilante de ADN, tal como  $\beta$ -propiolactona (BPL). Este proceso puede usarse para tratar diversos productos de cultivo celular que incluyen vacunas.

La divulgación incluye una vacuna que comprende propiedades inmunogénicas derivadas de un virus propagado en un cultivo celular, en el que la vacuna carece sustancialmente de ADN de cultivo celular funcional residual.

La funcionalidad de cualquier ADN residual de la célula huésped puede eliminarse por tratamiento del ADN con un agente alquilante que escinde el ADN en partes lo suficientemente pequeñas para que no pueda codificar una proteína funcional, se trasponga en un cromosoma humano receptor o de otra manera la maquinaria de replicación del ADN del receptor lo reconozca. La longitud del ADN de cultivo celular residual degradado (no funcional) es preferentemente menor de 1000 pares de bases (*por ejemplo* menor de 1000, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 ó 50 pares de bases). Preferentemente, la longitud del ADN de cultivo celular residual degradado es menor de 500 pares de bases. Más preferentemente, la longitud del ADN de cultivo celular residual degradado es menor de 200 pares de bases.

Como se usa en el presente documento, la alusión "ADN funcional" o "ARN funcional" indica una secuencia de nucleótidos que puede traducirse en una proteína funcional o transponerse en un cromosoma de mamífero. Generalmente, las secuencias de nucleótidos que pueden traducirse en una proteína funcional requiere regiones promotoras, codones de inicio, codones de terminación y secuencias codificantes internas para proteínas funcionales. Cuando se produce lesión del ADN, como a partir de la adición de un agente alquilante, muchas de estas regiones se modifican o se destruyen, de manera que la traducción puede continuar durante más tiempo o continuar solo para formar una subunidad oligopeptídica de la proteína deseada.

El "ADN de cultivo celular funcional residual degradado" se refiere a un ADN funcional que no puede traducirse en una proteína funcional o transponerse en un cromosoma de mamífero. Preferentemente, "el ADN funcional residual degradado" tiene una longitud menor de 1000 pares de bases, más preferentemente menor de 500 pares de bases, incluso más preferentemente menor de 250 pares de bases y más preferentemente menor de 100 pares de bases. La longitud del ADN funcional residual degradado puede determinarse por técnicas convencionales, que incluyen electroforesis en gel.

Los procedimientos de la presente invención permiten composiciones de vacunas que carecen sustancialmente de ADN de cultivo celular funcional residual. Como se usa en el presente documento, carecer sustancialmente de ADN de cultivo celular funcional residual se refiere a una composición en la que los fragmentos de ADN residual de menos de 200 pares de bases pueden detectarse en menos de 10 ng por 0,5 ml. El tamaño de cualquier ADN de cultivo celular residual puede medirse por técnicas convencionales, incluyendo electroforesis en gel con capilar y tecnología de amplificación de ácidos nucleicos.

El uso de un agente alquilante tal como BPL en la presente invención proporciona la ventaja adicional de reducir la agregación de contaminantes. Las formulaciones de vacunas con menos agregados también pueden tener inmunogenicidad mejorada. La inmunogenicidad de una vacuna se basa en la especificidad de los anticuerpos por epítopes virales particulares. Si la superficie de una proteína está unida o tapada por moléculas desconocidas u ocultas por la agregación en macromoléculas grandes, los epítopes pueden hacerse menos reconocibles y por lo tanto menos eficaces en una vacuna. Además, las formulaciones de vacunas con agregados reducidos pueden tener ventajas de procesamiento adicionales. Los procesos de purificación dependen del aislamiento de la proteína esperada, *por ejemplo* hemaglutinina y neuraminidasa en una vacuna contra la gripe. Si la proteína se modifica estructuralmente por la presencia de agregados o entrecruzamiento puede no reconocerse y posteriormente eliminarse por cromatografía de columna, filtración o centrifugación.

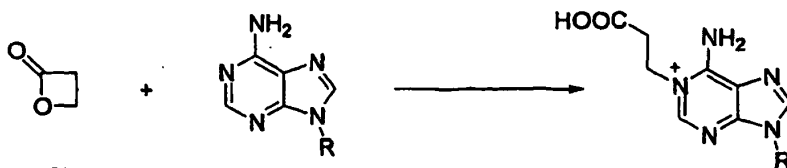
**Agentes alquilantes**

Los agentes alquilantes para su uso en la presente invención incluyen sustancias que introducen un radical alquilo en un compuesto. Preferentemente, el agente alquilante es un agente monoalquilante, tal como BPL. La BPL es un agente monoalquilante ampliamente usado para la inactivación de virus en la preparación de muchas vacunas. La BPL reacciona con diversas moléculas biológicas incluyendo ácidos nucleicos en los que produce una modificación estructural por alquilación y depurinación. Generalmente la BPL se representa por la siguiente estructura:



5 *In vitro*, la BPL generalmente reacciona con nucleófilos presentes en elevadas concentraciones, en condiciones favorables para reacciones de sustitución de nucleófilos - como con calor elevado, concentraciones de BPL elevadas y disolventes polares apróticos - para formar ácidos propiónicos funcionalizados, tales como 7-(2-carboxietil)guanina o 1-(2-carboxietil)desoxiadenosina (Esquema 1). Boutwell y col. *Annals New York Academy of Sciences*, 751-764; Perrin y col. *Biologicals*, 23 (1995) 207-211; Chen y col. *Carcinogenesis*, 2(2) (1981) 73-80.

**Esquema 1 (de Chen y col.):**



**BPL                      Desoxiadenosina    1-(2-carboxietil)desoxiadenosina**

10 Dicha unión o alquilación de bases de ADN induce a mutagenicidad mediante varios mecanismos que incluyen sustituciones de pares de bases, especialmente depurinación, deleciones y entrecruzamiento de nucleósidos. El elevado grado de mutagenicidad y reactividad de BPL se corresponde con una destrucción viral rápida y posterior degradación del ADN con respecto a productos no carcinogénicos.

15 Cualquier ADN de cultivo celular funcional residual se degrada por tratamiento con menos del 1% de BPL (*por ejemplo* menos del 1%, 0,75%, 0,5%, 0,25%, 0,2%, 0,1%, 0,075%, 0,05%, 0,025%, 0,01% o 0,005%). Preferentemente, el ADN de cultivo celular funcional residual se degrada por tratamiento con entre el 0,1% y el 0,01% de BPL.

El agente alquilante se añade preferentemente a una solución tamponada y el pH de la solución se mantiene preferentemente entre 5 y 10. Más preferentemente el pH de la solución se mantiene entre 6 y 9. Incluso más preferentemente el pH de la solución se mantiene entre 7 y 8.

20 En algunos procedimientos, el agente de alquilación se añade más de una vez. Por ejemplo, puede realizarse un primer tratamiento con BPL y después puede realizarse un segundo tratamiento con BPL. Entre el primer y segundo tratamiento puede existir una etapa de eliminación del agente alquilante, pero el agente alquilante puede añadirse para el segundo tratamiento sin eliminar ningún agente alquilante restante del primer tratamiento.

25 Preferentemente, el agente alquilante también se usa como el agente inactivante para el virus usado en la vacuna. Los agentes alquilantes de la presente invención se prefieren sobre agentes de inactivación tradicionales, tales como formaldehído, que puede entrecruzar proteínas con otros materiales, que incluyen ADN de la célula huésped. Dicho entrecruzamiento puede conducir a la formación de agregados (tales como conglomerados de proteína-proteína, combinaciones de nucleótidos y combinaciones de proteínas-nucleótidos). Debido a que los agentes alquilantes, tales como BPL, no se basan en mecanismos de entrecruzamiento para la inactivación viral, el uso de dichos agentes alquilantes para la inactivación viral minimiza la formación de agregados y otras impurezas en el producto de vacuna. Dichos agregados pueden comprender proteínas iónica o covalentemente unidas a otras proteínas, proteínas iónica o covalentemente unidas a otros nucleótidos y/o nucleótidos iónica o covalentemente unidos a otros nucleótidos.

30 Como se usa en el presente documento, la alusión a "agregación" o "un agregado" indica una masa o cuerpo de unidades individuales o partículas unidas entre sí para crear grupos o partículas más grandes. Generalmente la agregación puede determinarse por mediciones cuantitativas de los componentes deseados antes y después de una posible etapa de agregación o antes y después de la aplicación de un procedimiento de modificación del agregado (*por ejemplo* por tratamiento con detergente), por electroforesis en gel (tal como el sistema de Laemmli), cromatografía, turbidez de solución o estudios de sedimentación y otros procedimientos bien conocidos en la técnica.

35 El tratamiento con el agente alquilante, particularmente con BPL, puede implicar fases con diferentes temperaturas. Por ejemplo, puede existir una primera fase a una baja temperatura (*por ejemplo*, entre 2-8 °C, tal como aproximadamente 4 °C) y una segunda fase a una temperatura más elevada, típicamente al menos 10 °C más alta que la primera fase (*por ejemplo*, entre aproximadamente 25-50 °C, tal como aproximadamente 37 °C). Este proceso bifásico es particularmente útil cuando el agente alquilante va a usarse para la inactivación y la degradación del ADN. En un esquema típico, la inactivación del virus se produce durante la fase de menor temperatura y la degradación del ADN se produce durante la fase de mayor temperatura. Como se describe con mayor detalle a continuación, un aumento de

temperatura también puede facilitar la eliminación de un reactivo alquilante termo sensible.

### **Proteínas inmunogénicas**

5 Las proteínas inmunogénicas adecuadas para su uso en la presente invención pueden derivar de cualquier virus que sea la diana de una vacuna. Las proteínas inmunogénicas pueden formularse como virus inactivados (o destruidos), virus atenuados, formulaciones de virus fragmentados, formulaciones de subunidades purificadas, proteínas virales que se aíslan, purifican o derivan de un virus y partículas de tipo virus (VTP).

10 Las proteínas inmunogénicas para su uso en la presente invención son antígenos virales que incluyen preferentemente epítopes que se exponen en la superficie del virus durante al menos una fase de su ciclo de vida. Los antígenos virales se conservan preferentemente a través de múltiples serotipos o aislados. Los antígenos virales incluyen antígenos derivados de uno o más de los virus expuestos a continuación así como los ejemplos de antígenos específicos indicados a continuación. Los virus pueden no estar recubiertos o, preferentemente, recubiertos. Los virus son preferentemente virus de ARN, y más preferentemente virus de ARNm. Pueden tener un genoma con sentido o preferentemente, antisentido. Sus genomas pueden ser no segmentados o, preferentemente, segmentados.

15 *Orthomixovirus*: los antígenos virales pueden derivar de un *Orthomixovirus*, tal como Gripe A, B y C. Los antígenos de *Orthomixovirus* pueden seleccionarse de una o más de las proteínas virales, que incluyen hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz (M1), proteína de membrana (M2), uno o más de los componentes de la transcriptasa (PB1, PB2 y PA). Los antígenos preferidos incluyen HA y NA.

20 Los antígenos de la gripe pueden derivar de cepas gripales interpandémicas (anuales). Como alternativa los antígenos gripales pueden derivar de cepas con posibilidad de causar brotes pandémicos o pandemias (es decir, cepas gripales con nueva hemaglutinina en comparación con una hemaglutinina en cepas circulantes actuales, o cepas gripales que son patógenas en aves y que tienen el potencial de transmitirse horizontalmente a la población humana o cepas gripales que son patógenas para seres humanos). Dependiendo de la estación particular y de la naturaleza del antígeno incluido en la vacuna, los antígenos gripales pueden derivar de uno o más de los siguientes subtipos de hemaglutinina: H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16.

25 Los antígenos gripales de la presente invención pueden derivar de una cepa gripal aviar, particularmente una cepa gripal aviar muy patógena (HPAI). Alexander, *Avian Dis* (2003) 47(Suplem 3.): 916-81).

A continuación se proporcionan detalles adicionales de antígenos gripales.

30 Las composiciones pueden incluir una o más proteínas inmunogénicas adecuadas para su uso en sujetos pediátricos. Los sujetos pediátricos son típicamente menores de 3 años o menos de aproximadamente 2 años o menores de aproximadamente 1 año. Los antígenos pediátricos pueden administrarse varias veces durante el transcurso de 6 meses, 1, 2 ó 3 años. Los antígenos pediátricos pueden derivar de un virus que puede dirigir poblaciones pediátricas y/o de un virus para el cual las poblaciones pediátricas son susceptibles de infección.

35 Las composiciones pueden incluir una o más proteínas inmunogénicas adecuadas para su uso en individuos de edad avanzada o inmunocomprometidos. Dichos individuos pueden necesitar vacunarse más frecuentemente, con dosis más elevadas o con formulaciones con adyuvantes para mejorar su respuesta inmune contra los antígenos diana.

40 Después del cultivo de los virus, el agente alquilante puede usarse en viriones purificados, *por ejemplo* sobre viriones presentes en un cultivo celular depurado, o en viriones purificados procedentes de dicho cultivo celular depurado. Un procedimiento de la presente invención puede implicar eliminar material celular por depuración y después la purificación de viriones procedentes del cultivo celular depurado, *por ejemplo* por cromatografía. El agente alquilante puede usarse en viriones purificados de esta manera o después de una etapa adicional opcional de ultrafiltración/diafiltración. Los procedimientos preferidos usan el agente alquilante no sobre el sobrenadante depurado de un cultivo celular infectado, sino sobre viriones purificados procedentes de dicho sobrenadante depurado (véase, Morgeaux y col. (1993) *Vaccine* 11: 82-90).

45 El agente alquilante se usa preferentemente después de que haya tenido lugar una etapa de eliminación de endotoxinas.

### **Etapas del procedimiento**

50 Las composiciones de vacunas de la presente invención pueden prepararse aislando la proteína inmunogénica y degradando el ADN residual funcional de la célula huésped. De manera similar, las formulaciones de proteína recombinante pueden prepararse aislando o purificando la proteína recombinante y degradando el ADN residual funcional de la célula huésped. Estas etapas pueden realizarse secuencial o simultáneamente. La etapa de degradación del ADN de cultivo celular funcional residual se realiza por adición de un agente alquilante, *por*

*ejemplo*, BPL.

El agente alquilante y cualquier producto secundario residual se elimina preferentemente antes de la formulación final de la vacuna o proteína recombinante. Preferentemente, la formulación de composición de vacuna o de proteína recombinante contiene menos del 0,1% de ácido propiónico libre y BPL combinado (*por ejemplo* menos del 0,1%, 0,05%, 0,025%, 0,01%, 0,005%, 0,001% o 0,01%). Preferentemente, la formulación de composición de vacuna final o de proteína recombinante contiene menos del 0,01% de BPL.

La BPL puede eliminarse convenientemente por calor, para producir hidrólisis en el ácido  $\beta$ -hidroxipropiónico no tóxico. La duración del tiempo necesario para la hidrólisis depende de la cantidad total de BPL y de la temperatura. Temperaturas elevadas proporcionan una hidrólisis más rápida, pero la temperatura no debe aumentar tanto para no lesionar los principios proteicos activos. Como se describe a continuación, el calentamiento a aproximadamente 37°C durante 2-2,5 horas es adecuado para la eliminación de BPL.

Después del tratamiento del ADN, los productos de ADN residuales pueden conservarse en la composición inmunogénica o recombinante final. Sin embargo, más preferentemente, se separan de los componentes deseados, *por ejemplo* se separan de viriones/proteínas. La separación de esta manera puede eliminar los productos de degradación de ADN en parte o por completo, y preferentemente eliminar cualquier ADN degradado que sea >250 pb. Por lo tanto un procedimiento de la presente invención puede incluir una etapa de separación del ADN de viriones. Esta etapa de separación puede implicar, *por ejemplo*, una o más de ultrafiltración, ultracentrifugación (incluyendo ultracentrifugación en gradiente), sedimentación de los núcleos virales y fragmentación del sobrenadante, cromatografía (tal como cromatografía de intercambio iónico, *por ejemplo* intercambio aniónico), adsorción, etc.

En resumen, por lo tanto, un procedimiento puede implicar el tratamiento con un agente alquilante para degradar la longitud del ADN residual y posterior purificación para eliminar el ADN residual (incluyendo la eliminación del ADN degradado).

#### **Cultivo celular**

Las vacunas de la divulgación se preparan de virus que se propagan en cultivos de células.

En la técnica se conocen varias líneas celulares de mamíferos e incluyen líneas celulares derivadas de células de primates humanos o no humanos (*por ejemplo* monos) (*por ejemplo* células PER.C6 que se describen, *por ejemplo*, en los documentos WO01/38362, WO01/41814, WO02/40665, WO2004/056979 y WO2005/080556, incorporados por referencia en el presente documento en su totalidad, así como depositados con el número de depósito 96022940 en la CECC), MRC-5 (CCL-171 en la CACT), WI-38 (CCL-75 en la CACT), células HEK, células HeLa, células pulmonares fetales de mono rhesus (CL-160 en la CACT), células renales embrionarias de ser humano (células 293, típicamente transformadas por corte de ADN de adenovirus de tipo 5), células Vero (de riñón de mono), células de caballo, vaca (*por ejemplo*, células MDBK), de oveja, de perro (*por ejemplo*, células MDCK de riñón de perro, CCL34 MDCK (NBL2) o MDCK 33016, de la CACT, número de depósito DSM ACC 2219 como se describe en los documentos WO 97/37000 y WO 97/37001), células de gato y roedor (*por ejemplo*, células de hámster, tales como células BHK21-F, HKCC, o células de ovario de hámster chino (CHO)) y pueden obtenerse de una amplia diversidad de fases de desarrollo que incluyen *por ejemplo*, la fase adulta, neonatal, fetal y embrionaria.

Las células de mono adecuadas son, *por ejemplo*, células de mono verde africano, tales como células renales como la línea celular Vero. Las células de perro adecuadas son, *por ejemplo*, células renales, como en la línea celular MDCK. Por lo tanto, las líneas celulares adecuadas, incluyen pero sin limitación: MDCK; CHO; 293T; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; etc. El uso de células de mamífero significa que las vacunas pueden carecer de materiales tales como ADN de pollo, proteínas de huevo (tales como ovoalbúmina y ovomucoide), etc., reduciendo por lo tanto la alergenicidad.

En determinadas realizaciones las células se immortalizan (*por ejemplo* células PER.C6, ECACC 96022940). En realizaciones preferidas, se utilizan células de mamíferos y pueden seleccionarse de y/o derivar de uno o más de los siguientes tipos de células no limitantes: células de fibroblastos (*por ejemplo*, dérmicas, pulmonares), células endoteliales (*por ejemplo*, aórticas, coronarias, pulmonares, vasculares, microvasculares, dérmicas, umbilicales), hepatocitos, queratinocitos, células inmunes (*por ejemplo* linfocitos T, linfocitos B, macrófagos, NK, dendríticas), células de mamífero (*por ejemplo* epiteliales), células del músculo liso (*por ejemplo*, vasculares, aórticas, coronarias, arteriales, uterinas, bronquiales, cervicales, pericitos retinianos), melanocitos, células nerviosas (*por ejemplo*, astrocitos), células prostáticas (*por ejemplo* epiteliales, del músculo liso), células renales o del riñón (*por ejemplo* epiteliales, mesangiales, túbulo proximales), células esqueléticas (*por ejemplo* condrocitos, osteoclastos, osteoblastos), células musculares (*por ejemplo*, mioblastos, esqueléticas, lisas, bronquiales), células hepáticas,

células retinales o retinoblastos, células pulmonares y células estromales.

Los documentos WO97/37000 y WO97/37001 describen la producción de células animales y líneas celulares que pueden cultivarse en suspensión y en medios sin suero y que son útiles en la producción y replicación de virus, particularmente virus gripales. En los documentos WO03/023021 y WO03/023025 se proporcionan detalles adicionales.

Las líneas celulares de mamíferos preferidas para el cultivo de virus gripales incluyen: células MDCK, derivadas de riñón canino de Madin Darby, células Vero, derivadas de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*); o células PER.C6 derivadas de retinoblastos embrionarios humanos. Estas líneas celulares se encuentran ampliamente disponibles, *por ejemplo*, en la Colección Americana de Cultivos Tipo (CACT), en los Repositorios de Células de Coriell, o en la Colección Europea de Cultivos de Células (CECC). Por ejemplo, la CACT proporciona diferentes células Vero con los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587 y proporciona células MDCK con el número de catálogo CCL-34. PER.C6 se encuentra disponible en la CECC con el número de depósito 96022940.

Las líneas celulares más preferidas para cultivar virus gripales son las líneas celulares de MDCK. La línea celular original MDCK se encuentra disponible en la CACT como CCL-34, pero también pueden usarse derivados de esta línea celular. Por ejemplo, el documento WO97/37000 desvela una línea celular de MDCK que se adaptó para cultivar en un cultivo en suspensión ('MDCK 33016', depositada como DSM ACC 2219). De manera similar, el documento EP-A-1260581 (WO01/64846) desvela una línea celular derivada de MDCK que se cultiva en un cultivo en suspensión sin suero ('B-702', depositada como FERM BP-7449). El documento WO2006/071563 desvela células MDCK no tumorígenas, que incluyen 'MDCK-S' (ATCC PTA-6500), 'MDCK-SF101' (PTA-6501 de la CACT), 'MDCK-SF102' (PTA-6502 de la CACT) y 'MDCK-SF103' (PTA-6503). El documento WO2005/113758 desvela líneas celulares de MDCK con elevada susceptibilidad a infección, que incluye células 'MDCK.5F1' (CRL-12042 de la CACT). Puede usarse cualquiera de estas líneas celulares de MDCK.

En los documentos WO97/37000, WO97/37001, WO03/023021 y WO03/023025, se describe la manipulación de cultivos de células MDCK en suspensión y cultivos adherentes. En particular, los documentos WO 03/023021 y WO 03/023025 describen volúmenes de cultivos celulares a escala de laboratorio y comercial de células MDCK en suspensión en medios sin suero, medios químicamente definidos y medios sin proteínas. Cada referencia se incorpora en el presente documento en su totalidad.

Como una alternativa a las fuentes de mamíferos, las líneas celulares para su uso en la presente invención pueden derivar de fuentes aviares tales como pollo, pato, ganso, codorniz o faisán. Las líneas celulares aviares pueden derivar de una diversidad de fases del desarrollo que incluyen la fase embrionaria, de polluelo y de adulto. Preferentemente, las líneas celulares derivan de células embrionarias, tales como fibroblastos embrionarios, células germinales u órganos individuales, que incluyen neuronal, cerebro, retina, riñón, hígado, corazón, músculo o tejidos extra-embriónicos y membranas que protegen al embrión. Los ejemplos de líneas celulares aviares incluyen células madre embrionarias aviares (documentos WO01/85938 y WO03/076601) y células retinales de pato (documento WO2005/042728). Las células madre embrionarias aviares adecuadas, incluyen la línea celular EBx derivada de células madre embrionarias de pollo, EB45, EB14 y EB14-074 (documento WO2006/108846). También pueden usarse fibroblastos de embrión de pollo (FEP). Estas células aviares son particularmente adecuadas para el cultivo de virus gripales.

Los expertos en la materia conocen sistemas de expresión de células de insectos, tales como sistemas de expresión recombinantes en baculovirus, y se describen, *por ejemplo*, en Summers y Smith, Texas Agricultural Experiment Station Bulletin N° 1555 (1987). Los materiales y procedimientos para los sistemas de expresión de células en baculovirus/inserto se encuentran comercialmente disponibles en forma de kit, entre otros, en Invitrogen, San Diego CA. Las células de insecto para su uso con vectores de expresión de baculovirus incluyen, *entre otras*, *Aedes aegypti*, *Autographa californica*, *Bombyx mori*, *Drosophila melanogaster*, *Spodoptera frugiperda* y *Trichoplusia ni*.

La expresión de proteínas recombinantes puede realizarse en huéspedes bacterianos tales como *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* y *Streptococcus spp.* Los huéspedes de levaduras adecuados para la expresión de proteínas recombinantes incluyen *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Candida maltosa*, *Hansenula polymorpha*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis*, *Pichia guilliermondii*, *Pichia pastoris*, *Schizosaccharomyces pombe* y *Yarrowia lipolytica*.

Las condiciones de cultivo para los tipos de células indicados anteriormente se describen bien en una diversidad de publicaciones, o de manera alternativa el medio de cultivo, complementos y condiciones pueden adquirirse en el mercado, tal como se describe, *por ejemplo*, en el catálogo y bibliografía adicional de Cambrex Bioproducts (East

Rutherford, NJ).

En determinadas realizaciones, las células huéspedes usadas en los procedimientos descritos en el presente documento se cultivan en medios sin suero y/o sin proteínas. Un medio sin suero, en el contexto de la presente invención, se refiere a un medio en el que no hay aditivos de suero de origen animal o humano. Se entiende que los medios de cultivo sin proteínas son aquellos en los que se produce la multiplicación de las células sin proteínas, factores de crecimiento, otros aditivos proteicos y proteínas no séricas, pero opcionalmente pueden incluir proteínas tales como tripsina u otras proteasas que son necesarias para el crecimiento viral. Las células que se desarrollan en dichos cultivos contienen naturalmente proteínas por sí mismas.

Los medios sin suero conocidos incluyen medio de Iscove, medio Ultra-CHO (BioWhittaker) o EX-CELL (JRH Bioscience). Los medios que contiene suero normal incluyen Medio Basal de Eagle (BME) o Medio Esencial Mínimo (MEM) (Eagle, Science, 130, 432 (1959)) o Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM o EDM), que se usan normalmente con hasta el 10% de suero fetal de ternero o aditivos similares. Opcionalmente, puede usarse el Medio Esencial Mínimo (MEM) (Eagle, Science, 130, 432 (1959)) o el Medio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM o EDM) sin ningún suero que contenga complemento. Los medios sin proteína de tipo PF-CHO (JRH Bioscience), medios químicamente definidos como ProCHO 4CDM (BioWhittaker) o SMIF 7 (Gibco/BRL Life Technologies) y péptidos mitogénicos como Primactona, Pepticasa o HyPep™ (todos de Quest International) o hidrolizado de lactoalbúmina (Gibco y otros fabricantes) son también adecuadamente conocidos en la técnica anterior. Los aditivos de medios basados en hidrolizados de plantas tienen la ventaja especial de que puede descartarse la contaminación con virus, micoplasma o agentes infecciosos desconocidos.

Las condiciones de cultivo celular (temperatura, densidad celular, valor pH, etc.) son variables sobre un intervalo muy amplio debido a la idoneidad de la línea celular empleada de acuerdo con la presente invención y pueden adaptarse a las necesidades de las condiciones de cultivo del virus particular o a detalles de expresión recombinante.

Las células pueden cultivarse de diversas maneras, *por ejemplo*, en suspensión, en cultivos de adherencia o microvehículos.

Las células pueden cultivarse a menos de 37°C (*por ejemplo* 30-36°C) durante la replicación viral (documento WO97/37001).

El procedimiento para la propagación de virus en células cultivadas generalmente incluye las etapas de inocular las células cultivadas con la cepa a cultivar, cultivar las células infectadas durante un periodo de tiempo deseado para la propagación del virus, tal como se determina, *por ejemplo*, mediante titulación de virus o expresión antigénica (*por ejemplo* entre 24 y 168 horas después de la inoculación) y recoger el virus propagado. Las células cultivadas pueden inocularse con un virus (medido por UFP o DICT<sub>50</sub>) a una proporción celular de 1:500 a 1:1, preferentemente de 1:100 a 1:5, más preferentemente de 1:50 a 1:10. El virus puede añadirse a una suspensión de las células o aplicarse a una monocapa de las células y el virus se absorbe en las células durante al menos 60 minutos pero normalmente menos de 300 minutos, preferentemente entre 90 y 240 minutos de 25 °C a 40 °C, preferentemente de 28 °C a 37 °C.

El cultivo celular infectado (*por ejemplo* monocapas) puede eliminarse por congelación-descongelación o por acción enzimática para aumentar el contenido viral de los sobrenadantes de cultivo recogidos. Después, los líquidos recogidos se inactivan o se conservan congelados. Las células cultivadas pueden infectarse a una multiplicidad de infección ("m.d.i.") de aproximadamente 0,0001 a 10, preferentemente de 0,002 a 5, más preferentemente de 0,001 a 2. Aún más preferentemente, las células se infectan a una m.d.i. de aproximadamente 0,01. Las células infectadas pueden recogerse de 30 a 60 horas post-infección. Preferentemente, las células se recogen de 34 a 48 horas post-infección. Aún más preferentemente, las células se recogen de 38 a 40 horas post-infección. Generalmente se añaden proteasas (típicamente tripsina) durante el cultivo celular para permitir la liberación viral, y las proteasas pueden añadirse en cualquier fase adecuada durante el cultivo.

Las composiciones de vacuna de la presente invención se formularán generalmente en una forma subviriónica, *por ejemplo*, en forma de un virus fragmentado, en el que la cubierta lipídica viral se ha disuelto o modificado o en forma de una o más proteínas virales purificadas. La composición de vacuna contendrá una cantidad suficiente de antígeno (o antígenos) para producir una respuesta inmunológica en el paciente.

En la técnica se conocen bien procedimientos de fragmentación de virus, tales como los virus de la gripe, véanse *por ejemplo* los documentos WO02/28422, WO02/067983, WO02/074336, WO01/21151, etc. La fragmentación de los virus se realiza modificando o fragmentando el virus completo, tanto infeccioso (de tipo silvestre o atenuado) como no infeccioso (*por ejemplo* inactivado), con una concentración de modificación de un agente de fragmentación. Los agentes de fragmentación generalmente incluyen agentes que pueden degradar y disolver



membranas lipídicas, típicamente con una cola hidrófoba unida a una cabeza hidrófila. El agente de fragmentación más preferido es bromuro de cetil trimetil amonio (BCTA). A continuación se proporcionan detalles adicionales de fragmentación en el contexto de virus de la gripe.

5 La rotura da como resultado una solubilización total o parcial de las proteínas de los virus, modificando la integridad de los virus. Los agentes de fragmentación preferidos son tensioactivos no iónicos e iónicos (*por ejemplo*, catiónicos), *por ejemplo* alquilglucosidos, alquiltioglucoídos, azúcares de acilo, sulfobetáinas, betaínas, polioxietilenaalquiléteres, N,N-dialquil-Glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-poli-etoxietanoles, compuestos de amonio cuaternario, sarcosilo, los BCTA (bromuros de cetil trimetil amonio), tri-*N*-butilfosfato, Cetavlon, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina y DOT-MA, los polioxietanoles octil- o nonilfenoxi (*por ejemplo* los tensioactivos Tritón, tales como Tritón X-100 o Tritón N101), ésteres de polioxietileno sorbitán (los tensioactivos Tween), éteres de polioxietileno, ésteres de polioxietileno, *etc.*

10 Los procedimientos para la purificación de proteínas individuales de virus se conocen bien e incluyen, *por ejemplo*, filtración, cromatografía, etapas de centrifugación y elución en fibra hueca. En una realización, las proteínas se purifican por resina de intercambio iónico.

15 Como una alternativa adicional, la vacuna puede incluir un virus completo *por ejemplo* un virus completo vivo atenuado o, preferentemente, un virus completo inactivado. En la técnica se conocen procedimientos de inactivación o eliminación de virus para destruir su capacidad para infectar células de mamíferos. Dichos procedimientos incluyen medios químicos y físicos. Los medios químicos para inactivar un virus incluyen el tratamiento con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído, formalina, BPL o luz ultravioleta. Los medios químicos adicionales para la inactivación incluyen tratamiento con azul de metileno, psoraleno, carboxifulereno (C60) o una combinación de cualquiera de los mismos. Otros procedimientos de inactivación viral se conocen bien en la técnica, tales como *por ejemplo*, etilamina binaria, acetil etileneimina o radiación gamma. Preferentemente, los virus se inactivan con BPL.

#### 20 **Composiciones farmacéuticas**

25 Las composiciones son farmacéuticamente aceptables. Éstas normalmente incluyen componentes además de los antígenos *por ejemplo* incluyen típicamente uno o más vehículos y/o excipientes farmacéuticos. Una minuciosa discusión de dichos componentes se encuentra disponible en Remington: The Science and Practice of Pharmacy (Gennaro, 2000; edición nº 20, ISBN: 0683306472).

Las composiciones estarán generalmente en forma acuosa.

30 La composición puede incluir uno o más conservantes, tales como tiomersal o 2-fenoxietanol. Sin embargo, se prefiere, que la vacuna carezca sustancialmente de material de mercurio (*es decir*, menos de 5 µg/ml) *por ejemplo* sin tiomersal (Banzhoff (2000) Immunology Letters 71: 91-96; documento WO02/097072). Las vacunas que no contienen mercurio son las más preferidas. En particular se prefieren vacunas sin conservantes.

35 Se prefiere incluir una sal fisiológica, tal como sal de sodio, para controlar, *por ejemplo*, la tonicidad. Se prefiere el cloruro de sodio (NaCl), que puede estar presente a aproximadamente 1 y 20 mg/ml. Otras sales que pueden estar presentes incluyen cloruro potásico, fosfato diácido potásico, fosfato disódico dehidrato, cloruro de magnesio, cloruro de calcio, *etc.*

40 Las composiciones tendrán generalmente una osmolaridad de entre 200 mOsm/kg y 400 mOsm/kg, preferentemente entre 240-360 mOsm/kg y se incluirán más preferentemente dentro del intervalo de 290-310 mOsm/kg.

Las composiciones pueden incluir uno o más tampones. Los tampones típicos incluyen: un tampón fosfato, un tampón Tris; un tampón borato, un tampón succinato, un tampón de histidina (particularmente con un adyuvante de hidróxido de aluminio); o un tampón citrato. Los tampones típicamente se incluirán en el intervalo de 5-20 mM.

45 El pH de una composición será generalmente de entre 5,0 y 8,1 y más típicamente entre 6,0 y 8,0 *por ejemplo* 6,5 y 7,5. Por lo tanto un procedimiento de la presente invención puede incluir una etapa para ajustar el pH de la vacuna a granel antes de realizar el envasado.

La composición es preferentemente estéril. La composición es preferentemente no pirógena, conteniendo, *por ejemplo*, <1 UE (unidad de endotoxina, una medida convencional) por dosis y preferentemente <0,1 UE por dosis. Preferentemente la composición carece de gluten.

50 Las composiciones pueden incluir detergente, *por ejemplo* un tensioactivo de éster de polioxietileno sorbitán (conocido como 'Tweens'), un octoxinol (tal como octoxinol-9 (Tritón X-100) o t-octilfenoxipolietoxietanol), un

bromuro de cetil trimetil amonio ('BCTA') o desoxicolato de sodio. El detergente puede estar presente solamente en cantidades traza.

5 La composición puede incluir material para una sola inmunización o puede incluir material para múltiples inmunizaciones (*por ejemplo*, un kit 'multidosis'). La inclusión de un conservante es útil en dispositivos multidosis. Como una alternativa (o además) de incluir un conservante en las composiciones multidosis, las composiciones pueden incluirse en un envase que tenga un adaptador aséptico para extraer el material.

Las vacunas se administran típicamente en un volumen de dosificación de aproximadamente 0,5 ml, aunque a un niño puede administrarse la mitad de la dosis (*es decir*, aproximadamente 0,25 ml).

10 Las composiciones y los kits se conservan preferentemente entre 2 °C y 8 °C. No deben congelarse. Idealmente deben mantenerse alejados de la luz directa.

### **Procedimientos de tratamiento y administración de vacunas**

Las composiciones son adecuadas para administrar a animales (y, en particular, al ser humano), y la presente invención proporciona un procedimiento para provocar una respuesta inmune en un paciente, que comprende la etapa de administrar al paciente una composición de la presente invención.

15 La respuesta inmune que provoca estos procedimientos incluirá generalmente una respuesta de anticuerpo, preferentemente una respuesta de anticuerpo protectora. En la técnica se conocen bien procedimientos para evaluar respuestas, capacidad de neutralización y protección de anticuerpos después de la vacunación viral. Para el virus de la gripe, *por ejemplo*, estudios en seres humanos han demostrado que las titulaciones de los anticuerpos contra la HA se correlacionan con protección (una titulación de inhibición de hemoaglutinación en una muestra de suero de aproximadamente 30-40 proporciona aproximadamente una protección del 50% de infección por un virus homólogo) [Potter y Oxford (1979) Br Med Bull 35: 69-75].

Las composiciones pueden administrarse de diversas maneras. La vía de inmunización más preferida es por inyección intramuscular (*por ejemplo* en el brazo o en la pierna), pero otras vías posibles incluyen inyección subcutánea, intranasal, oral, intradérmica, transcutánea, transdérmica, *etc.*

25 Las vacunas preparadas de acuerdo con la presente invención pueden usarse para tratar niños y adultos. El paciente puede ser menor de 1 año, de 1-5 años, de 5-15 años, de 15-55 años y al menos 55 años de edad. Los pacientes pueden ser personas mayores (*por ejemplo*  $\geq 50$  años,  $\geq 60$  años y preferentemente  $\geq 65$  años), jóvenes (*por ejemplo*  $\leq 5$  años), pacientes hospitalizados, trabajadores sanos, personal de las fuerzas armadas y militares, mujeres en estado de gestación, enfermos crónicos, pacientes inmunodeficientes, pacientes que han tomado un compuesto antiviral (*por ejemplo* un compuesto para la gripe, oseltamivir o zanamivir; véase a continuación) 7 días antes de recibir la vacuna, personas alérgicas al huevo y personas que viajan al extranjero. Sin embargo, las vacunas no son exclusivamente adecuadas para estos grupos y pueden usarse más generalmente en una población.

35 El tratamiento puede realizarse en un programa de dosis único o en un programa de dosis múltiple. Las dosis múltiples pueden usarse en un programa de inmunización primario y/o en un programa de inmunización de refuerzo. En un programa de dosis múltiple las diversas dosis pueden administrarse por las mismas vías o diferentes, *por ejemplo* una primera por vía parenteral y un refuerzo a través de la mucosa, o una primera a través de la mucosa y un refuerzo por vía parenteral, *etc.* La administración de más de una dosis (típicamente dos dosis) es particularmente útil en pacientes inmunológicamente no tratados. Las dosis múltiples se administrarán típicamente al menos con 1 semana de diferencia (*por ejemplo* aproximadamente 2 semanas, aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 4 semanas, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 8 semanas, aproximadamente 10 semanas, aproximadamente 12 semanas, aproximadamente 16 semanas, *etc.*).

45 Las vacunas producidas por la presente invención pueden administrarse a pacientes sustancialmente al mismo tiempo (*por ejemplo* durante la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario o centro de vacunación) que otras vacunas *por ejemplo* sustancialmente al mismo tiempo que una vacuna contra bacterias, tal como una vacuna contra la difteria, una vacuna contra el tétanos, una vacuna contra la tos ferina, una vacuna contra DTP (difteria, tos ferina y tétanos), una vacuna conjugada contra *H. influenzae* de tipo b, una vacuna conjugada contra el meningococo (tal como una vacuna tetravalente A-C-W135-Y), una vacuna conjugada contra el neumococo, *etc.*

50 De manera similar, las vacunas pueden administrarse a pacientes sustancialmente al mismo tiempo (*por ejemplo* durante la misma consulta médica o visita a un profesional sanitario) como un compuesto antiviral eficaz contra el virus de la vacuna. Cuando la vacuna es una vacuna contra la gripe, *por ejemplo*, el compuesto (o los compuestos) puede ser un inhibidor de neuraminidasa (*por ejemplo* oseltamivir y/o zanamivir). Estos antivirales incluyen un ácido

(3R, 4R, 5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico o un ácido 5-(acetilamino)-4-[(aminoiminometil)-amino]-2,6-anhidro-3,4,5-trideoxi-D-glicero-D-galactonon-2-enónico, incluyendo ésteres de los mismos (*por ejemplo* los ésteres de etilo) y sales de los mismos (*por ejemplo* las sales fosfato). Un antiviral preferido eficaz contra la gripe es el ácido (3R, 4R, 5S)-4-acetilamino-5-amino-3(1-etilpropoxi)-1-ciclohexeno-1-carboxílico, éster etílico, fosfato (1:1), conocido también como fosfato de oseltamivir (TAMIFLU™).

### **ADN de células huéspedes**

La medición de ADN residual de células huéspedes se encuentra dentro de las habilidades normales del experto en la materia. La cantidad total de ADN residual en las composiciones de la presente invención es preferentemente menor que 20 ng/ml *por ejemplo* ≤10ng/ml, ≤5ng/ml, ≤1ng/ml, ≤100pg/ml, ≤10pg/ml, etc. Como se ha descrito anteriormente, sustancialmente todo este ADN es preferentemente menor de 500 pares de bases de longitud.

El ensayo usado para medir el ADN será típicamente un ensayo validado (Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) Center for Veterinary Medicine (CVM). Mayo del 2001; Lundblad (2001) Biotechnology and Applied Biochemistry 34: 195-197). Las características de la realización de un ensayo validado pueden describirse en términos matemáticos y cuantificables, y se habrán identificado sus posibles fuentes de error. El ensayo generalmente se habrá ensayado para determinar características tales como exactitud, precisión y especificidad. Una vez ajustado (*por ejemplo*, contra cantidades convencionales conocidas de ADN de la célula huésped) y probado el ensayo pueden entonces realizarse, de manera rutinaria, las mediciones cuantitativas de ADN. Para la cuantificación del ADN pueden usarse tres técnicas principales: procedimientos de hibridación, tales como transferencias de Southern o transferencias por ranura (Ji et al. (2002) Biotechniques. 32: 1162-7); procedimientos por inmunoensayo, tales como el Sistema Threshold™ (Briggs (1991) J Parenter Sci Technol. 45: 7-12.); y PCR cuantitativa (Lahijani y col. (1998) Hum Gene Ther. 9: 1173-80). Los expertos en la materia conocen todos estos procedimientos, aunque las características exactas de cada procedimiento pueden depender de la célula huésped en cuestión, *por ejemplo*, la elección de sondas para la hibridación, la elección de cebadores y/o de sondas para la amplificación, etc. El sistema Threshold™ de *Molecular Devices* es un ensayo cuantitativo para determinar niveles picogramo de ADN total, y se han usado para controlar niveles de ADN contaminante en compuestos biofarmacéuticos (Briggs (1991) *anteriormente*). Un ensayo típico implica la formación no específica de secuencias de un complejo de reacción entre una proteína de unión a ADNmc bitonilada, un anticuerpo anti-ADNmc conjugado con ureasa y ADN. Todos los componentes del ensayo se incluyen en el Kit de Ensayo de ADN Total completo proporcionado por el fabricante. Diversos fabricantes comerciales ofrecen ensayos de PCR cuantitativos para detectar el ADN residual de células huéspedes, *por ejemplo*, AppTec™ Laboratory Services, BioReliance™, Althea Technologies, etc. En Lokteff y col. (2001) Biologicals. 29: 123-32, puede encontrarse una comparación de un ensayo de hibridación quimioluminiscente y el sistema Threshold™ de ADN total para medir la contaminación de ADN de células huéspedes de una vacuna viral humana.

Estos diversos procedimientos analíticos también pueden usarse para medir la longitud del ADN residual de células huéspedes. Como se ha mencionado anteriormente, la longitud promedio del ADN residual de células huéspedes, después del tratamiento con el agente alquilante, es preferentemente menor de 500 pares de bases o incluso menor de 200 pares de bases.

En relación a células caninas, tales como, en particular, células MDCK, el análisis del genoma revela 13 secuencias codificantes <500 pb de longitud, 3 secuencias <200 pb y 1 secuencia <100 pb. Por lo tanto la fragmentación del ADN a <200 pb elimina sustancialmente todas las secuencias codificantes y es muy poco probable que cualquier fragmento correspondiese realmente a uno de los 3 genes alrededor de esta longitud (concretamente: secretina de 81 pb; PYY de 108 pb; y osteocalcina de 135 pb).

### **Adyuvantes**

Las composiciones pueden incluir un adyuvante, que puede actuar para mejorar las respuestas inmunes (celular y/o humoral) provocadas en un paciente que recibe la composición. El uso de adyuvantes con vacunas virales se conoce bien, *por ejemplo*, en vacunas contra la hepatitis, vacunas contra la polio, etc. La vacuna gripal FLUAD™ incluye un adyuvante de emulsión de aceite en agua.

Los adyuvantes que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, sales de aluminio, oligonucleótidos inmunoestimuladores, saponinas, análogos de lípido A (tal como 3dMPL) y emulsiones de aceite en agua. Estos y otros adyuvantes se divulgan con más detalle en Powell y Newman (Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach, Plenum Press 1995, ISBN 0-306-44867-X) y O'Hagan (Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols, volumen 42 of Methods in Molecular Medicine series, ISBN: 1-59259-083-7).

Pueden usarse adyuvantes conocidos como hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio. Estos nombres son

convencionales, sin embargo se usan por comodidad solamente, como tampoco hay una descripción exacta del compuesto químico real que está presente (*por ejemplo*, véase el capítulo 9 de Powell y Newman). La presente invención puede usar cualquiera de los adyuvantes de "hidróxido" o "fosfato" que son de uso general como adyuvantes. Se prefiere la adsorción a estas sales.

5 Se conocen bien oligonucleótidos inmunoestimuladores con actividad adyuvante. Estos pueden contener un motivo CpG (una secuencia de dinucleótidos que contiene una citosina no metilada unida a una guanosina por un enlace fosfato), un motivo TpG, una secuencia oligo-dT, una secuencia oligo-dC, un ARN bicatenario, secuencias palindrómicas, una secuencia poli(dG), *etc.* Los oligonucleótidos inmunoestimuladores típicamente comprenderán al menos 20 nucleótidos y pueden comprender menos de 100 nucleótidos.

10 Las saponinas (capítulo 22 de Powell y Newman) son un grupo heterólogo de glucósidos de esteroles y glucósidos triterpenoides que se encuentran en la corteza, hojas, tallos, raíces e incluso flores de una amplia diversidad de especies vegetales. Las saponinas de la corteza del árbol *Quillaja saponaria* Molina se ha estudiado ampliamente como adyuvantes. Las formulaciones de adyuvantes con saponina incluyen formulaciones purificadas, tales como QS21, así como formulaciones lipídicas, tales como las ISCOM. Se han purificado composiciones de saponina  
15 usando HPLC y RP-HPLC y usando estas técnicas se han identificado fracciones específicas purificadas, que incluyen, QS7, QS17, QS18, QS21, QH-A, QH-B y QH-C. Preferentemente, la saponina es QS21. En la patente de Estados Unidos 505740, se describe un procedimiento para la producción de QS21. Las formulaciones de saponina también pueden comprender un esteroles, tal como colesterol (documento WO96/33739). Las combinaciones de saponinas y colesteroles pueden usarse para formar partículas únicas denominadas complejos inmunoestimulantes (ISCOM), que típicamente también incluirán un fosfolípido.

20 El 3dMPL (también conocido como monofosforil lípido A 3-de-O-acilado o monofosforil lípido A monofosforil 3-O-desacilado-4') es un adyuvante en el que la posición 3 de la glucosamina reductora terminal en el monofosforil lípido A se ha desacilado. El 3dMPL se ha preparado a partir de mutantes de *Salmonella minnesota* sin heptosa y es químicamente similar al lípido A pero carece de un grupo fosforilo ácido inestable y un grupo acilo básico inestable.  
25 El 3dMPL puede tomar la forma de una mezcla de moléculas relacionadas, que varían por su acilación (*por ejemplo* con 3, 4, 5 ó 6 cadenas acilo, que pueden ser de longitudes diferentes).

Se conocen diversas emulsiones de aceite en agua con actividad adyuvante. Estas incluyen típicamente al menos un aceite y al menos un tensioactivo, siendo el aceite (o aceites) y el tensioactivo (o tensioactivos) biodegradables (metabolizables) y biocompatibles. Las gotas de aceite en la emulsión generalmente tienen diámetros de  
30 submicrómetros, consiguiéndose estos pequeños tamaños con un microfluidizador para proporcionar emulsiones estables. Se prefieren las gotas con un tamaño inferior a 220 nm ya que puede someterse a esterilización por filtración.

Los adyuvantes de emulsión específicos de aceite en agua útiles incluyen, pero sin limitación:

35 • Una emulsión submicrométrica de escualeno, Tween 80 y Span 85. La composición de la emulsión por volumen puede ser aproximadamente 5% de escualeno, aproximadamente 0,5% de polisorbato 80 y aproximadamente 0,5% de Span 85. En cuanto al peso, estas proporciones llegan a ser 4,3% de escualeno, 0,5% de polisorbato 80 y 0,48% de Span 95. Este adyuvante se conoce como 'MF59', como se describe con más detalle en el capítulo 10 de Powell y Newman y en el capítulo 12 de O'Hagan. La emulsión MF59 incluye ventajosamente iones citrato *por ejemplo* tampón de citrato de sodio 10 mM.

40 • Una emulsión de escualeno, un tocoferol, y Tween 80. La emulsión puede incluir solución salina tamponada con fosfato. También puede incluir Span 85 (*por ejemplo* al 1%) y/o lecitina. Estas emulsiones pueden tener del 2 al 10% de escualeno, del 2 al 10% de tocoferol y del 0,3 al 3% de Tween 80 y la proporción en peso de escualeno: tocoferol es preferentemente  $\leq 1$  ya que proporciona una emulsión más estable. El escualeno y el Tween 80 pueden estar presentes en una proporción de volumen de aproximadamente 5:2. Una emulsión de este tipo puede  
45 prepararse disolviendo Tween 80 en PBS para proporcionar una solución al 2%, después mezclar 90 ml de esta solución con una mezcla de (5g de DL- $\alpha$ -tocoferol y 5 ml de escualeno), después microfluidizar la mezcla. La emulsión resultante puede tener gotitas submicrométricas de aceite *por ejemplo* con un diámetro promedio de entre 100 y 250 nm, preferentemente aproximadamente 180 nm.

50 • Una emulsión de escualeno, un tocoferol y un detergente de Tritón (*por ejemplo* Tritón X-100). La emulsión también puede incluir un 3d-MPL. La emulsión puede contener un tampón fosfato.

• Una emulsión que comprende un polisorbato (*por ejemplo* polisorbato 80), un detergente de Tritón (*por ejemplo* Tritón X-100) y un tocoferol (*por ejemplo* un  $\alpha$ -tocoferol succinato). La emulsión puede incluir estos tres componentes a una proporción de masa de aproximadamente 75:11:10 (*por ejemplo*, 750  $\mu\text{g/ml}$  de polisorbato 80, 110  $\mu\text{g/ml}$  de Tritón X-100 y 100  $\mu\text{g/ml}$  de  $\alpha$ -tocoferol succinato) y estas concentraciones deben incluir cualquier

contribución de estos componentes de antígenos. La emulsión también puede incluir escualeno. La emulsión también puede incluir un 3d-MPL. La fase acuosa puede contener un tampón fosfato.

### Vacunas contra la gripe

5 La invención es particularmente adecuada para preparar vacunas contra el virus de la gripe. Diversas formas de vacunas contra el virus de la gripe se encuentran actualmente disponibles, véanse, *por ejemplo*, los capítulos 17 y 18 de Plotkin & Orenstein (Vaccines, 4ª edición, 2004, ISBN: 0-7216-9688-0). Generalmente se basan en virus vivos o en virus inactivados. Las vacunas inactivadas pueden basarse en viriones completos, viriones "fragmentados" o sobre antígenos de superficie purificados (incluyendo hemaglutinina). Los antígenos contra la gripe también pueden presentarse en forma de virosomas (partículas liposomales de tipo viral sin ácidos nucleicos). También pueden usarse antígenos purificados de un huésped recombinante (*por ejemplo* en una línea celular de insecto usando un vector baculovirus).

15 Los medios químicos para inactivar un virus incluyen tratamiento con una cantidad eficaz de uno o más de los siguientes agentes: detergentes, formaldehído, β-propiolactona, azul de metileno, psoraleno, carboxifulereno (C60), etilamina binaria, acetil etileneimina o combinaciones de los mismos. En la técnica se conocen procedimientos no químicos de inactivación viral, tales como, *por ejemplo*, luz ultravioleta o radiación gamma.

Los viriones pueden recogerse de líquidos que contienen virus por diversos procedimientos. Por ejemplo, un proceso de purificación puede implicar centrifugación zonal usando una solución en gradiente lineal de sacarosa que incluye detergente para romper los viriones. Después, los antígenos pueden purificarse, tras dilución opcional, por diafiltración.

20 Los viriones fragmentados se obtienen tratando viriones purificados con detergentes (por ejemplo etil éter, polisorbato 80, desoxicolato, tri-*N*-butil fosfato, Triton X-100, Triton N101, bromuro de cetil metil amonio, *etc.*) para producir preparaciones subviriónicas que incluyen los procesos de fragmentación "Tween-éter". En la técnica se conocen procedimientos para fragmentar virus de la gripe, *por ejemplo*, en los documentos WO02/28422, WO02/067983, WO02/074336, WO01/21151, WO02/097072, WO2005/113756 *etc.* La fragmentación de virus se realiza típicamente rompiendo o fragmentando el virus completo, tanto infeccioso como no infeccioso con una concentración modificada de un agente de fragmentación. Esta desestabilización da como resultado una solubilización total o parcial de las proteínas del virus, modificando la integridad del virus. Los agentes de fragmentación preferidos son tensioactivos no iónicos e iónicos (por ejemplo catiónicos), *por ejemplo*, alquilglucósidos, alquiltioglucoídos, azúcares de acilo, sulfobetainas, betainas, polioxietilenealquiléteres, N, N-dialquil-Glucamidas, Hecameg, alquilfenoxi-polietoxietanoles, compuestos de amoniaco cuaternario, sarcosilo, los BCTA (bromuros de cetil trimetil amonio), tri-*N*-butil fosfato, Cetavlon, sales de miristiltrimetilamonio, lipofectina, lipofectamina, y DOT-MA, los octil- o nonilfenoxi polioxietanoles (por ejemplo los tensioactivos de Tritón, tales como Tritón X-100 o Tritón N101), ésteres de polioxietileno sorbitán (tensioactivos Tween), éteres de polioxietileno, esterres de polioxietileno, *etc.* Un procedimiento de fragmentación útil usa los efectos consecutivos del desoxicolato de sodio y formaldehído y la fragmentación puede producirse durante la purificación inicial del virión (por ejemplo en una solución de gradiente de densidad en sacarosa). Por lo tanto, un proceso de fragmentación puede implicar la depuración del material que contiene viriones (para eliminar el material sin viriones), la concentración de los viriones recogidos (por ejemplo usando un procedimiento de absorción, tal como absorción en CaHPO<sub>4</sub>), la separación de viriones completos de material sin viriones, la fragmentación de viriones usando un agente de fragmentación en una etapa de centrifugación en gradiente de densidad (por ejemplo usando un gradiente en sacarosa que contiene un agente de fragmentación tal como desoxicolato de sodio) y después filtrando (por ejemplo, ultrafiltración) para eliminar materiales no deseados. Los viriones fragmentados pueden resuspenderse convenientemente en solución de cloruro de sodio isotónica tamponada con fosfato de sodio.

45 Las vacunas con antígenos de superficie purificadas comprenden los antígenos de superficie de la gripe hemaglutinina y, típicamente, también neuraminidasa. En la técnica se conocen bien los procesos para preparar estas proteínas en forma purificada.

Para su uso en vacunas, las cepas del virus de la gripe, cambian de una estación a otra. En el período inter-pandémico actual, las vacunas típicamente incluyen dos cepas de la gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa de la gripe B, y son típicas las vacunas trivalentes. La invención también puede usar HA de cepas pandémicas (es decir cepas para las cuales el receptor de la vacuna y la población humana en general está inmunológicamente sin tratar) tales como cepas del subtipo H2, H5, H7 o H9 (en particular del virus de la gripe A) y las vacunas contra la gripe para cepas pandémicas pueden ser monovalentes o pueden basarse en una vacuna trivalente normal complementada con una cepa pandémica. Sin embargo, dependiendo de la estación y de la naturaleza del antígeno incluido en la vacuna, la invención puede proteger contra uno o más de los subtipos H1, H2, H3, H4, H5, H6, H7, H8, H9, H10, H11, H12, H13, H14, H15 o H16 de hemaglutinina del virus de la gripe A.

Así como adecuada para inmunizar contra cepas inter-pandémicas, las composiciones son particularmente útiles para inmunizar contra cepas pandémicas. Las características de una cepa de la gripe que le dan la posibilidad de causar un brote pandémico son: (a) contiene una nueva hemaglutinina en comparación con las hemaglutininas en las cepas humanas actualmente circulantes, es *decir*, una que no se ha manifestado en la población humana más de una década (por ejemplo H2) o no se ha observado anteriormente de todo en la población humana (por ejemplo H5, H6 o H9 que generalmente sólo se han observado en poblaciones de aves), de manera que la población humana estará inmunológicamente sin tratar previamente con la hemaglutinina de la cepa; (b) puede transmitirse horizontalmente a la población humana; y (c) es patógena para el ser humano. Se prefiere un virus con hemaglutinina de tipo H5 para inmunizar contra la gripe pandémica, tal como la cepa H5N1. Otras cepas posibles incluyen H5N3, H9N2, H2N2, H7N1 y H7N7 y cualquier otra cepa pandémica potencialmente emergente. Dentro del subtipo H5N3, un virus puede incluirse en clado 1 de HA, clado 1' de HA, clado 2 de HA o clado 3 de HA (Organización Mundial de la Salud (2005) Emerging Infectious Diseases 11 (10): 1515-21.), siendo los clados 1 y 3 particularmente relevantes. Otras cepas cuyos antígenos pueden incluirse convenientemente en las composiciones son cepas que son resistentes a terapia antiviral (resistentes, por ejemplo, a oseltamivir y/o zanamivir), incluyendo cepas pandémicas resistentes.

Las composiciones pueden incluir un antígeno (o antígenos) de una o más (por ejemplo 1, 2, 3, 4 o más) cepas del virus de la gripe, incluyendo virus de la gripe A y/o virus de la gripe B. Se prefiere una vacuna trivalente, que incluya antígenos de dos cepas del virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B.

El virus de la gripe puede ser una cepa reordenada, y puede haberse obtenido por técnicas genéticas inversas. Por lo tanto un virus de la gripe A pueden incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/PR/8/34 (típicamente 6 segmentos de A/PR/8/34, siendo los segmentos de HA y N de una cepa de vacuna, es decir un reordenamiento 6:2). Este también puede incluir uno o más segmentos de ARN de un virus A/WSN/33 o de cualquier otra cepa de virus útil para generar virus reordenados para la preparación de una vacuna. Típicamente, las composiciones protegen contra una cepa que puede transmitirse de ser humano a ser humano, y por lo tanto el genoma de la cepa normalmente incluirá al menos un segmento de ARN que se originó en un virus de la gripe de mamífero (por ejemplo un ser humano). Este puede incluir un segmento NS que se originó en un virus de la gripe aviar.

La HA es el inmunógeno principal en las vacunas contra la gripe inactivadas actuales y las dosis de vacuna se normaliza por referencia a niveles de HA, típicamente medidos por SRID. Típicamente, las vacunas existentes contienen aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque pueden usarse menores cantidades, *por ejemplo*, en niños o en situaciones pandémicas o cuando se usa como adyuvante. Se han usado dosis fraccionadas tales como ½ (es decir 7,5 µg de HA por cepa), ¼ y ⅙, ya que tienen dosis superiores (por ejemplo 3x o 9x dosis). Por tanto, las vacunas pueden incluir entre 0,1 y 150 µg de HA por cepa de gripe, preferentemente entre 0,1 y 50 µg por ejemplo 0,1-20 µg, 0,1-15 µg, 0,1-10 µg, 0,1-7,5 µg, 0,5-5 µg, *etc.* Las dosis particulares incluyen, *por ejemplo*, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5 aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 1,9, aproximadamente 1,5, *etc.* por cepa.

Para las vacunas vivas, la dosificación se mide por medio de la dosis infecciosa de cultivo tisular (DICT<sub>50</sub>) en lugar del contenido de HA y es típica una DICT<sub>50</sub> de aproximadamente 10<sup>6</sup> y 10<sup>8</sup> (preferentemente entre 10<sup>6,5</sup> – 10<sup>7,5</sup>) por cepa.

La HA usada con la invención puede ser una HA natural como se encuentra en un virus o puede haberse modificado. Por ejemplo, se sabe que modificar la HA para eliminar determinantes (*por ejemplo* regiones hiperbásicas alrededor del sitio de escisión entre HA1 y HA2) hace que un virus sea muy patógeno en especies aviares.

Después de tratar una composición que contiene viriones para degradar ADN de la célula huésped (*por ejemplo*, con BPL), los productos de degradación se eliminan preferentemente de los viriones, *por ejemplo*, por cromatografía de intercambio aniónico. Una vez que el virus de la gripe se ha purificado para una cepa particular, puede combinarse con virus de otras cepas para preparar, *por ejemplo*, una vacuna trivalente como se describe anteriormente. Se prefiere tratar cada cepa por separado y mezclar volúmenes monovalentes para proporcionar una mezcla multivalente final, en lugar de mezclar virus y degradar el ADN de una mezcla multivalente.

### Generalidades

La expresión "que comprende" abarca "que incluye" así como "que consiste", *por ejemplo*, una composición "que comprende" X puede consistir exclusivamente en X o puede incluir algo adicional, *por ejemplo*, X + Y.

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", *por ejemplo*, una composición que es "carece sustancialmente" de Y puede carecer completamente de Y. Si fuera necesario, la palabra "sustancialmente" puede

omitirse de la definición de la invención.

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

5 Los términos "aislado" y "purificado" significan al menos una pureza del 50%, más preferentemente una pureza del 60% (como en la mayoría de las vacunas fragmentadas), más preferentemente una pureza del 70% o del 80% o del 90% o del 95% de pureza o una pureza superior al 99%.

A menos que se especifique en contra, un procedimiento que comprende una etapa de mezclar dos o más componentes no requiere ningún orden específico de mezcla. Por lo tanto los componentes pueden mezclarse en cualquier orden. Cuando existen tres componentes entonces pueden combinarse dos componentes entre sí y después la combinación puede combinarse con el tercer componente, *etc.*

10 Cuando en el cultivo de células se usan materiales de animales (y particularmente de bovinos), éstos deben obtenerse de fuentes sin encefalopatías espongiformes transmisibles (EET) y en particular sin encefalopatía espongiforme bovina (EEB). En general, se prefiere cultivar células en ausencia total de materiales derivados de animales.

15 Cuando se administra un compuesto en el cuerpo, como parte de una composición, entonces ese compuesto puede sustituirse alternativamente por un fármaco adecuado.

Cuando para el reordenamiento o procedimientos genéticos inversos, se usa un sustrato celular, este es preferentemente uno que se ha aprobado para su uso en la producción de vacunas humanas como, *por ejemplo*, en Ph Eur general capítulo 5.2.3.

#### **Breve descripción de los dibujos**

20 Las figuras 1 y 2 muestran los resultados de amplificación por PCR de 6 dianas identificadas en el genoma de MDCK. Algunas muestras se diluyeron, como se indica, hasta 1:10000, antes de realizar la PCR.

La figura 3 muestra los resultados de la amplificación por PCR de secuencias SINE en genoma de MDCK. Como en las figuras 1 y 2, el ADN se diluyó algo antes de realizar la PCR. En el panel inferior, las cifras indican la cantidad de ADN de partida en la PCR (fg).

25 La figura 4 muestra el efecto del tratamiento con BPL sobre el tamaño del ADN en MDCK. El ADN genómico se incubó con BPL a diferentes temperaturas y a diferentes duraciones de tiempo. La figura 5 muestra resultados similares. Los geles en agarosa se tiñeron con SYBRGold.

La figura 6 muestra electroforesis capilar de ADN residual (línea superior) respecto a marcadores (línea inferior) que tienen los tamaños indicados.

#### **Modos de realizar la invención**

30 Se cultivaron virus de la gripe (A/New Caledonia/20/99(H1N1), A/Panama/2007/99(H3N2); B/Jiangsu/10/2003; A/Wyoming/3/2003(H3N2)) en células MDCK en un cultivo en suspensión, siguiendo el contenido de los documentos WO97/37000, WO03/23025 y WO04/92360. El medio de cultivo final se depuró para proporcionar viriones, que se sometieron a cromatografía y ultrafiltración/diafiltración. Los viriones en el material resultante se inactivaron usando  $\beta$ -propiolactona (concentración final del 0,05% v/v; se incubó durante 16-20 horas a 2-8 °C y después se hidrolizó incubando a 37 °C durante 2-5 horas). Después se usó BCTA para fragmentar los viriones y diversas etapas de procesamiento adicionales proporcionaron una vacuna a granel monovalente final que contenía proteínas de superficie purificadas.

40 El ADN de MDCK se caracterizó para evaluar su cantidad, tamaño e integridad en tres fases en los procesos de fabricación: (A) después de la etapa de ultrafiltración/diafiltración; (B) después del tratamiento con  $\beta$ -propiolactona y (C) en el volumen monovalente final. Para investigar el tamaño, la integridad y la actividad biológica de cualquier ADN genómico residual, se usó electroforesis capilar en gel y amplificación de ácidos nucleicos.

#### **Determinación del tamaño**

45 Como se ha mencionado anteriormente, el tamaño del ADN residual de células huéspedes se analizó en las fases (A), (B) y (C) por electroforesis capilar en gel. El análisis se realizó en cinco cultivos de virus individuales.

Se extrajeron muestras de 500  $\mu$ l en estos tres puntos y se trataron con 10  $\mu$ l de proteinasa K a 56 °C durante 16 a 22 horas seguido de una extracción de ADN total con el kit extractor de ADN (Wako Chemicals) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ADN se resuspendió en 500  $\mu$ l de agua ultra pura para electroforesis en un sistema

de caracterización molecular P/ACE MDQ (Beckman Coulter) a una temperatura constante de 20 °C. Se usaron once marcadores de tamaño molecular de 72 a 1353 pb. En este procedimiento, el límite de detección (LD) de ácidos nucleicos fue de 0,7 pg/ml.

5 Basándose en los marcadores de tamaño y en la densidad relativa de las bandas de ADN, se determinó la distribución y el tamaño de los fragmentos de ADN y se asignó a cuatro categorías de tamaño diferentes que variaban entre <200 pb a >1000 pb. La figura 6 muestra la electroforesis capilar de una muestra en la fase (C). El análisis demuestra que todo el ADN residual detectable en esta muestra tiene una longitud sustancialmente inferior a 200 pb.

En la siguiente tabla se muestran los resultados promedio de los cinco cultivos:

Fase	Cantidad de ADN	<200 pb	200-500 pb	500-1000 pb	>1000 pb
A	47 mg	25%	12%	6%	55%
B	5 mg	79%	18%	3%	4%
C	0,07 mg	>99%	<LD	<LD	<LD

10

Por tanto, el tratamiento con BPL produce una reducción de ~10 veces en la cantidad de ADN, pero también modifica el modo de distribución desde secuencias largas hacia fragmentos cortos <200 pb. El procesamiento adicional, entre las fases (B) y (C), que incluye etapas de cromatografía y ultrafiltración, redujo los niveles de ADN total otras ~ 70 veces y eliminó todo el ADN detectable  $\geq$  200 pb.

#### 15 **Amplificación del ADN**

La transformación neoplásica celular es un fenómeno frecuentemente asociado con proto-oncogenes modificados y/o con genes supresores tumorales modificados. Mediante PCR, se analizaron secuencias de diversos genes tales como caninos, antes y después del tratamiento con BPL, es decir, en los puntos (A) y (B). Además, se trató y ensayó el ADN de células MDCK no infectadas. Los proto-oncogenes ensayados fueron: H-ras y c-myc. Los genes supresores tumorales ensayados fueron: p53; p21/waf-1; y PTEN. Además, se analizaron secuencias repetitivas SINE por PCR. El elevado número de copias para las SINE facilita la detección sensitiva.

20 Todas las muestras se adicionaron con un ADN de control externo (fragmento pUC19) para controlar la calidad de la preparación de la muestra y la PCR. En todos los experimentos se observó una amplificación constante del control añadido, indicando que la BPL hidrolizada residual y los subproductos presentes en las mezclas de PCR no tienen efectos inhibidores en el ensayo y garantizan una calidad de preparación de muestra suficiente y las muestras de PCR se diluyeron en etapas de 10 veces antes de la amplificación, hasta que los productos de la PCR no pudieron detectarse, indicando por lo tanto la reducción logarítmica de los niveles de ADN. El límite de detección para el ensayo por PCR es de 55 pg.

25 Los productos de la PCR se analizaron por electroforesis en gel de agarosa. La figura 1 muestra los resultados obtenidos en células MDCK no infectadas y la figura 2 muestra los resultados obtenidos durante el cultivo de los virus. Los seis genes analizados mostraron una fuerte señal de amplificación antes del tratamiento con BPL pero la fuerza de la señal disminuyó después de la exposición con BPL. En todos los lotes de producción ensayados, el ADN residual genómico de MDCK disminuyó en al menos 2 valores logarítmicos después de la exposición con BPL.

30 Como la figura 2 muestra los resultados en la fase (B), antes de la purificación adicional, los resultados presentan el ADN presente en exceso en las vacunas de volumen final. Sin embargo, debido a la sensibilidad cuando se usan secuencias SINE, la PCR también era posible en la fase (C), en el volumen monovalente final. En la Figura 3 se muestran los resultados de este análisis. La amplificación de ADN en (A) y en (B) fue relativamente similar para la región SINE, indicando que la BPL es menos activa en secuencias de ADN más pequeñas. Sin embargo, incluso para estas secuencias pequeñas, hubo una notable reducción en la señal de amplificación para todas las muestras analizadas. La comparación de las intensidades de señal de la PCR entre el punto de toma de muestra (B) y (C) refleja la reducción de ADN residual debido a las etapas de purificación intermedias.

35 40 Extrapolando a partir de los análisis basados en genes y basándose directamente en los análisis basados en SINE, se esperaba un nivel de ADN total de <1 ng por dosis y frecuentemente <100 pg por dosis.



## Temperatura

El tratamiento con BPL durante la inactivación del virus tuvo dos etapas independientes: (1) añadir BPL a la mezcla que contenía viriones a 2-8 °C; después (2) aumentar la temperatura a 37 °C para hidrolizar la BPL. Se investigaron los efectos de las dos etapas con BPL sobre la inactivación y fragmentación del ADN de MDCK.

- 5 El ADN genómico purificado de células MDCK no infectadas se trató con una concentración final de 0,05 % (v/v) de BPL a 2-8 °C durante 16 horas o a 37 °C ó 50 °C durante hasta 6,5 horas. Posteriormente se controló la fragmentación del ADN y los resultados se muestran en la Figura 4. Estos experimentos revelan la actividad de BPL contra el ADN celular, pero las células no infectadas no reflejan el estado de MDCK después del crecimiento viral porque el ADN celular ya está muy fragmentado debido a la apoptosis.
- 10 A 2-8 °C, la diferencia entre el ADN no tratado y tratado en un gel de agarosa fue insignificante, lo que sugirió que la fragmentación del ADN por BPL no se produce sustancialmente durante estas condiciones. Por el contrario, el ADN se modificó extremadamente a 37 °C y a 50 °C, conduciendo la mayor temperatura a una reacción cinética de reacción acelerada. El ADN de células no tratadas mostró una banda relativamente diferente en un gel de agarosa, con una ligera mancha de productos de degradación (figura 5, carril 3). Sin embargo, después de una corta incubación con BPL a 37 °C, el ADN de MDCK manchó la parte inferior de las ranuras del gel y disminuyó la intensidad de la señal de banda (figura 5, carril 2). Períodos más largos de incubación dieron como resultado la desaparición de las moléculas de ADN genómico grandes y fragmentación mejorada del ADN de MDCK.
- 15 En experimentos adicionales, se incubó BPL en primer lugar con células a 4 °C durante 16 horas. En una primera población, se elevó la temperatura a 37 °C durante 2 horas; en una segunda población, se eliminó la BPL por filtros de centrifugación y después se elevó la temperatura. En la primera población se observaron niveles de ADN residual mucho más bajos (>2 log inferior).
- 20 Por lo tanto la fragmentación del ADN observada durante el tratamiento con BPL parece ocurrir principalmente durante la etapa de hidrólisis de BPL a 37 °C en lugar de durante la etapa de inactivación del virus a 2- 8 °C.
- 25 Se entenderá que la invención se ha descrito a modo de ejemplo solamente y que pueden realizarse modificaciones que quedan incluidas dentro del ámbito de la presente invención.

**REIVINDICACIONES**

1. Un procedimiento de preparación de una vacuna contra el virus de la gripe formulada en una forma subviriónica que comprende proteínas inmunogénicas derivadas de un virus de la gripe propagado en un cultivo celular que comprende:
  - 5 (i) añadir un agente alquilante para degradar el ADN de cultivo celular funcional residual y también inactivar el virus.
  - (ii) modificar o fragmentar el virus completo con una concentración modificadora de un agente de fragmentación; y
  - (iii) aislar las proteínas inmunogénicas
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que dicho agente alquilante es  $\beta$ -propiolactona (BPL)
3. El procedimiento de la reivindicación 2, en el que dicho ADN de cultivo celular se degrada por tratamiento con
  - 10 menos del 0,1% de  $\beta$ -propiolactona (BPL).
4. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la vacuna resultante presenta un nivel de agregación reducido.
5. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en que la etapa (iii) implica separar el ADN de viriones.
6. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que el cultivo celular se selecciona de un grupo que
  - 15 consiste en células MDCK, células Vero y células PER.C6.
7. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que el agente de fragmentación es un tensioactivo no iónico o iónico.
8. El procedimiento de la reivindicación 7 en el que el agente de fragmentación en la etapa (iii) es bromuro de cetil trimetil amonio (BCTA).
9. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, en el que la vacuna subviriónica es una vacuna
  - 20 fragmentada.
10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la vacuna subviriónica es una vacuna a base de proteína viral purificada.
11. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior en el que las proteínas inmunogénicas son antígenos
  - 25 virales seleccionados del grupo que consiste en hemaglutinina (HA), neuraminidasa (NA), nucleoproteína (NP), proteína de matriz (M1), proteína de membrana (M2), uno o más de los componentes de la transcriptasa (PB1, PB2 y PA).
12. El procedimiento de la reivindicación 11 en el que la proteína inmunogénica es hemaglutinina (HA).
13. El procedimiento de la reivindicación 11 en el que la proteína inmunogénica es neuraminidasa (NA).
14. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, que comprende adicionalmente la etapa que consiste en
  - 30 formular las proteínas inmunogénicas en una vacuna.
15. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, que comprende:
  - (i) propagación de virus en un cultivo celular.
  - (ii) añadir un agente alquilante para degradar el ADN de cultivo celular funcional residual y también para inactivar
    - 35 los virus.
    - (iii) modificar o fragmentar el virus completo con una concentración modificadora de un agente de fragmentación;
    - (iv) aislar las proteínas virales; y
    - (v) formular las proteínas virales en una vacuna en forma de una o más proteínas virales purificadas.
16. El procedimiento de cualquier reivindicación anterior, que comprende las etapas de:
  - 40 (i) propagación de virus en células MDCK en suspensión;
  - (ii) clarificar el medio de cultivo para proporcionar viriones;
  - (iii) someter los viriones obtenidos en la etapa (ii) a cromatografía y a ultrafiltración/diafiltración;
  - (iv) inactivar los viriones con  $\beta$ -propiolactona;
  - (v) fragmentar los viriones con bromuro de cetil trimetil amonio (BCTA); y
  - 45 (vi) formular los viriones fragmentados en una vacuna.

Figura 1

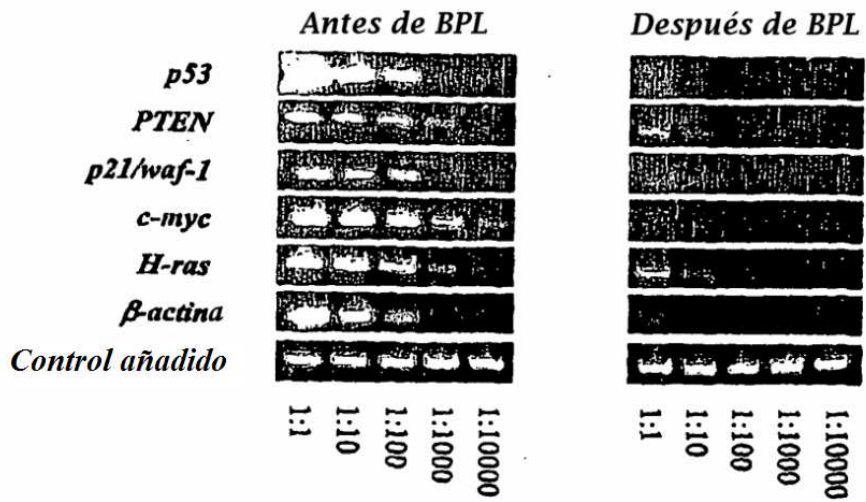


Figura 2

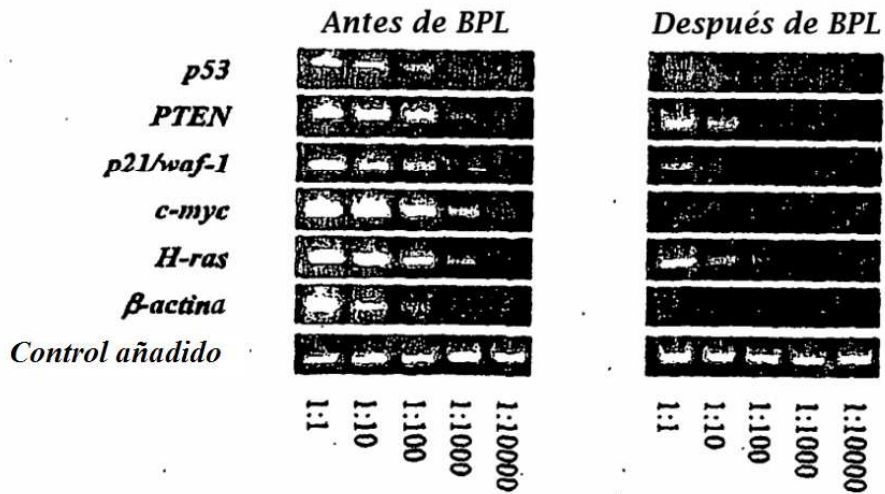


Figura 3



Figura 4

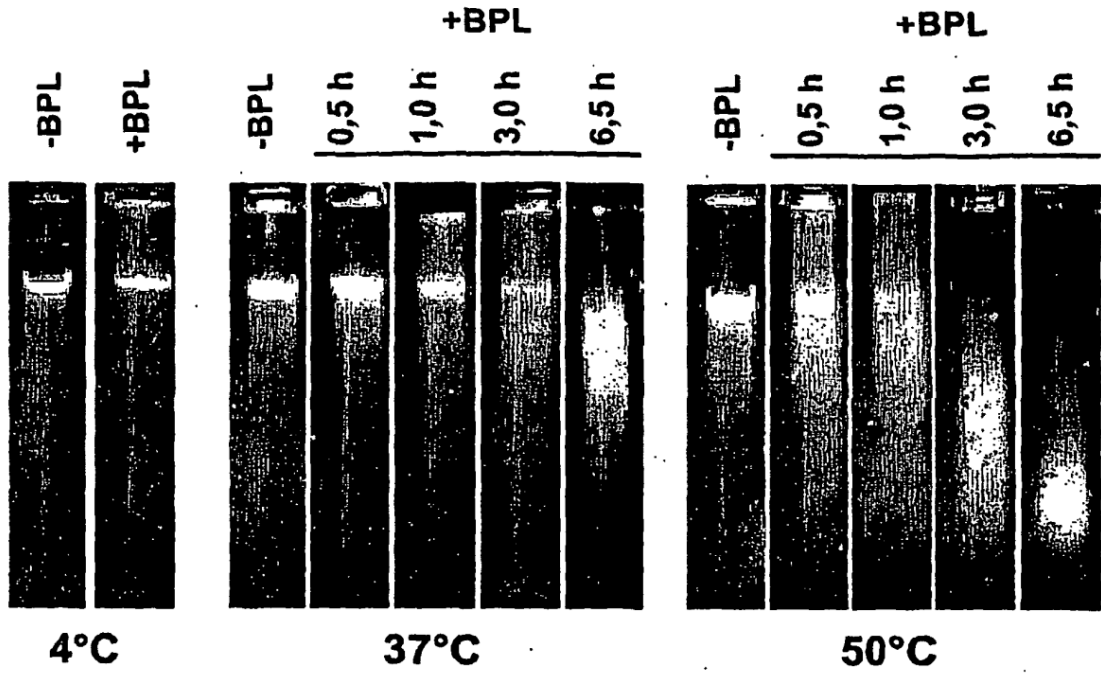
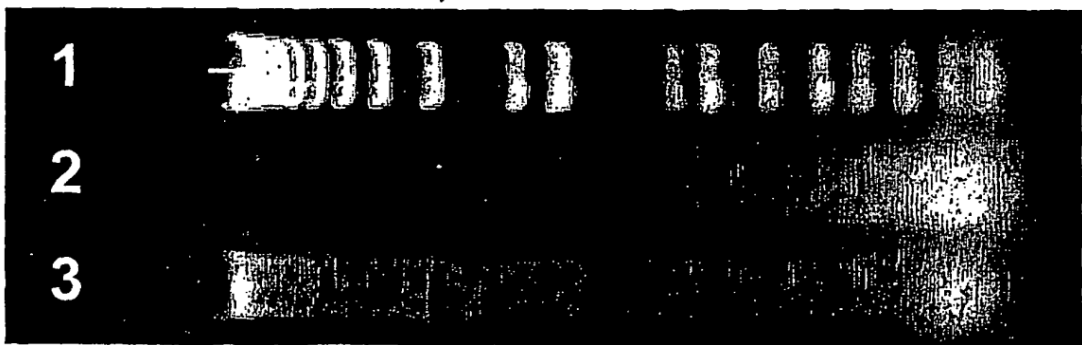


Figura 5



*Figura 6*

