

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 370 675**

51 Int. Cl.:

C12N 1/04 (2006.01)

A61K 35/76 (2006.01)

A61K 47/26 (2006.01)

A61K 47/30 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08718824 .9**

96 Fecha de presentación: **19.03.2008**

97 Número de publicación de la solicitud: **2121898**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **25.11.2009**

54 Título: **PROCEDIMIENTO PARA PROTEGER PARTÍCULAS VIRALES.**

30 Prioridad:
19.03.2007 GB 0705245
10.05.2007 US 917220 P

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
21.12.2011

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
21.12.2011

73 Titular/es:
STABILITECH LTD.
BESSEMER BUILDING, LEVEL 1
IMPERIAL COLLEGE LONDON SW7 2A, GB

72 Inventor/es:
DREW, Jeffrey

74 Agente: **Ungría López, Javier**

ES 2 370 675 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

Procedimiento para proteger partículas virales

5 **Campo de la invención**

La invención se refiere a procedimientos de proteger las partículas virales de degradación térmica y desecación. La invención también se refiere a productos que comprenden partículas virales conservadas.

10 **Antecedentes de la invención**

Algunas moléculas biológicas son lo suficientemente estables como para poder aislarlas, purificarlas y, después, almacenarlas en solución a temperatura ambiente. No obstante, esto no es posible para muchos materiales y se han intentado técnicas que implican almacenamiento a temperaturas bajas, adición de estabilizantes, liofilización, formación de vacío y desecación al aire para asegurar el tiempo de conservación. A pesar de la disponibilidad de estas técnicas, algunos materiales biológicos siguen mostrando niveles insatisfactorios de estabilidad durante el almacenamiento y algunas técnicas conducen a costes añadidos e incomodidad. Por ejemplo, un transporte y conservación refrigerados es costoso. Además, a menudo no se dispone de transporte refrigerado para el transporte de medicamentos, tales como vacunas en los países del mundo en vías de desarrollo.

En concreto, las tensiones de la desecación por congelación o liofilización pueden ser muy dañinas para algunos materiales biológicos. La liofilización de productos farmacéuticos biológicos implica la congelación de soluciones o suspensiones de materiales biológicos termosensibles, seguido de desecación primaria y secundaria. La técnica se basa en la sublimación de agua a temperatura bajo cero al vacío sin fundir la solución. La liofilización representa una etapa clave para fabricar proteínas sólidas y productos farmacéuticos de vacuna. El índice de difusión del vapor de agua desde el material biológico congelado es muy bajo y, por tanto, el procedimiento consume tiempo. Adicionalmente, tanto las etapas de congelación como de desecación introducen tensiones que son capaces de desplegar o desnaturalizar proteínas.

El documento WO-A-2006/0850082 da a conocer un producto desecado o conservado que comprende un azúcar, un material cargado tal como una proteína histona y un componente biológico de desecación o termosensible. El azúcar forma una matriz amorfo sólido. No obstante, la histona puede tener consecuencias inmunológicas si el componente biológico conservado se administra a un ser humano o animal.

35 **Resumen de la invención**

El presente inventor ha descubierto que las preparaciones virales mezcladas con una solución acuosa que contiene uno, dos o más azúcares y una polietilenimina (PEI) se conservan con desecación, tal como con desecación por congelación. La adición de uno o más azúcares a una preparación viral conduce a alguna conservación de infectividad viral y/o inmunogenicidad. No obstante, la adición de PEI junto con uno o más azúcares conduce, sorprendentemente, a una conservación mejorada de la infectividad viral y/o la inmunogenicidad. Una mejora particularmente preferida en la infectividad y/o la inmunogenicidad se ve a concentraciones relativamente bajas de PEI y a concentraciones relativamente altas de uno o más azúcares.

De acuerdo con esto, la presente invención proporciona un procedimiento para conservar las partículas virales, que comprende:

- (i) proporcionar a una solución acuosa uno o más azúcares, una polietilenimina y las partículas virales en las que la concentración de polietilenimina es inferior a 500 nM en base a la masa molar promedio en número (M_n) de la polietilenimina y la concentración de azúcar o, si hay más de un azúcar presente, la concentración total de azúcar es superior a 0,1M; y
- (ii) secar la solución para formar una matriz sólida amorfa que comprende dichas partículas virales.

La invención proporciona:

- un excipiente para la conservación de partículas virales, que comprende:

- (a) sacarosa, estaquiosa o rafinosa o cualquier combinación de las mismas; y
- (b) polietilenimina a una concentración basada en M_n inferior a 500nM;

- uso del excipiente para la conservación de partículas virales durante y después de la desecación por congelación.
- un kit que comprende el excipiente;
- un procedimiento de preparar una vacuna que comprende partículas virales, en el que el procedimiento comprende:

(a) proporcionar a una solución acuosa uno o más azúcares, una polietilenimina y las partículas virales en las que la concentración de polietilenimina es inferior a 500 nM en base a la masa molar promedio en número (M_n) de la polietilenimina y la concentración de azúcar o, si hay más de un azúcar presente, la concentración total de azúcar es superior a 0,1M; y

(b) opcionalmente añadir un adyuvante, tampón, antibiótico y/o aditivo a la mezcla; y

(c) secar la solución para formar una matriz sólida amorfa que comprende dichas partículas virales; y

- un polvo seco que comprende partículas virales conservadas obtenible mediante el procedimiento de la invención.

Breve descripción de las figuras

La Figura 1 muestra el efecto de un excipiente compuesto por PEI, sacarosa (Sac) y rafinosa (Raf) sobre la recuperación del virus de la enfermedad del pie-boca (FMDV-A) tras la desecación por congelación e incubación durante 24 horas a temperatura ambiente (TA) o tratamiento térmico durante 48 horas a 37 °C (TT). Los resultados también muestran que la solución salina tamponada con fosfato (PBS) no ofrece protección durante la desecación por congelación (DC). Las barras de error representan el error estándar de la media (n= 2).

La Figura 2 muestra que la PEI potencia la recuperación del FMDV-O cuando se añade a los azúcares (Sac) y estaquiosa (Estac). Los resultados obtenidos mediante el uso de un excipiente que contiene PEI, Sac y Estac se indican como "Poli". Los resultados obtenidos mediante el uso de un excipiente que contiene Sac y Estac sin PEI se indican como "Azúcar". El efecto se observa con FMDV-O tratado con calor durante 24 horas ("24 h TT") y 6 días ("TT 6 días"). Las barras de error representan el error estándar de la media (n= 2).

La Figura 3 muestra que la concentración inicial de azúcar en el excipiente es importante a la hora de mantener la estabilidad de FMDV-O. La dilución de una solución de sacarosa y estaquiosa (120 de Sac (3M):80 de Estac (0,75M)) a 1:10 en volumen produce una pérdida completa de los efectos protectoras de un excipiente con sólo azúcar. Las barras de error son el error estándar de la media (n= 3).

La Figura 4.1 muestra el efecto de la proporción de sacarosa (Sac):estaquiosa (Estaq.) sobre la recuperación de FMDV-O TT desecado por congelación con diversas concentraciones de PEI. Los resultados muestran que la adición de Estac aumenta la estabilidad. Se recopilaron los resultados para cada concentración de PEI. El análisis estadístico usando un ANOVA de una vía, seguido de una prueba de Turkey mostró una mezcla que contiene toda la Saca alcanzaba una recuperación significativamente menor que una que contenía una proporción de 140:60 en volumen de Sac:Estaq. . Las barras de error muestran el error estándar de la media (n= 8).

La figura 4.2 muestra el efecto de la proporción Sac:Estac sobre la recuperación de FMDV-O TT con varias concentraciones de histona (His) de acuerdo con el documento WO-A-2006/0850082. La histona era histona 2A obtenida en Boehringer Mannheim. Las barras de error mostradas son el error estándar de la media (n= 6).

La Figura 5 muestra el efecto de la optimización de las proporciones de Sac/Estac/PE sobre la recuperación de adenovirus. La formación de unidades formadoras de placas (UFP= se evaluó tras la desecación por congelación durante 12 horas y tratar con calor durante 24 horas. Los resultados demuestran que, cuando se usan los niveles más altos de Estac, las UFP del virus disminuyeron con rapidez. Cuando no hay Estac presente, las UFO se redujeron espectacularmente. Cuando se desecó por congelación solo con PBS, no había UFP. Las diluciones menores de PEI también parecían potenciar la recuperación de virus.

La Figura 6 muestra la recuperación de adenovirus en PEI y azúcar. La PEI y el excipiente de azúcar se optimizaron y compararon con 3 controles; azúcares solo, PBS y el título original (antes de la desecación por congelación). La desecación por congelación con PBS solo no mostró termoprotección. Los azúcares sólo mostraron alguna actividad viral, no obstante se observó mayor actividad usando PEI junto con azúcar en el excipiente. Las barras de error representan el error estándar de la media (n= 2).

La Figura 7 muestra que un excipiente que contiene Sac (1,5M)/Estac (0,125M) con PEI a una concentración de 0,02 nM parece óptima y demuestra una recuperación mejorada de adenovirus sobre solo una solución de Sac Estac solas. La PEI como el único excipiente mostró poca o ninguna protección durante la desecación por congelación.

La Figura 8 muestra los resultados de un experimento diseñado para comparar dos PEI diferentes sobre la recuperación de adenovirus. La PEI de alto peso molecular fue eficaz a una concentración mucho menor que la PE de bajo peso molecular. El PBS solo no mostró recuperación de virus. De nuevo, concentraciones óptimas de PEI/azúcar muestran mejor recuperación sobre los azúcares solos.

La Figura 9 muestra una comparación entre la dilución del PEI en agua ("PEIW") y la dilución del PEI en PBS ("PEIP"). Los resultados mostraron mayores títulos de adenovirus cuando PEI se diluyen en PBS en lugar de en agua. Cuando se usan como excipientes por sí solos, tanto PBS como el agua destilada mostraron un nivel muy bajo de recuperación de adenovirus.

Descripción detallada de la invención**Resumen**

5 La presente invención se refiere a la conservación de partículas virales mediante el contacto de las partículas virales con una mezcla de conservación. La mezcla de conservación es una solución acuosa de PEI y uno, dos o más azúcares. Se usan concentraciones bajas de PEI y concentraciones relativamente altas de azúcar. La solución en la que están presentes las partículas virales se seca después para formar una matriz sólida amorfa que comprende dichas partículas virales.

10 Por tanto, la invención permite conservar la estructura y la función del virus durante la etapa de desecación. Por tanto se puede mantener la actividad del virus tras la desecación. Las partículas virales conservadas demuestran mejor resistencia térmica y a la desecación, lo que permite la prolongación del periodo de vida, facilidad de almacenamiento y transporte, y evita la necesidad de una cadena de frío para la distribución. Por tanto, la invención puede proporcionar protección como crioprotector (protección contra los daños por congelación), lioprotector (protección contra la desecación) y/o un termoprotector (protección contra temperaturas mayores o menores de 4 °C).

Partículas virales

20 Normalmente, un virus entero o virión consiste en ácido nucleico rodeado por una cubierta proteica protectora o cápside. El ácido nucleico viral puede comprender ADN, ARN, ARN monocatenario, ARN bicatenario, ADN bicatenario, ARNm o cualquier combinación de los mismos.

25 La cápside está formada por subunidades. Muchas cápsides virales están formadas por subunidades que pueden tener simetría icosaédrica o helicoidal. Algunos tipos de virus también incluyen estructuras virales tales como una nucleocápside, estructuras adicionales tales como colas proteicas y paredes externas complejas, y estructuras complejas tales como una cabeza icosaédrica unida a una cola helicoidal.

30 La cápside puede también estar rodeada por una cubierta. La cubierta está compuesta por una bicapa de lipoproteínas y puede contener material de la membrana de una célula huésped, así como una de origen viral. Por ejemplo, la cubierta puede contener lípidos derivados de células y proteínas derivadas de virus. Los virus pueden también contener picos de lipoproteínas.

35 Las partículas virales usadas en la presente invención pueden ser virus enteros, tales como virus vivos, virus muertos, virus vivos atenuados, virus inactivados tales como virus químicamente inactivados o virus virulentos o no virulentos. Un virus vivo es capaz de infectar y reproducirse en el huésped viral. Un virus muerto está inactivado y no puede infectar el huésped viral. Las partículas pueden ser partículas similares a virus (VLP) o nucleocápsides.

40 La partícula viral puede ser o puede derivar de un virus de ADNds, un virus de ADNss, un virus de ARNds, un virus de ARNss (+), un virus de ARNss(-), un virus de ARNss-RT o un virus de ADNds-RT. Como ejemplo, pero sin desear que sea limitante, la partícula viral puede ser o derivar de un virus de las familias siguientes:

- adenoviridae, tal como adenovirus A, B, C, D, E o F, incluidos los serotipos humanos Ad5, Ad2, Ad6, Ad24;
- 45 - caliciviridae tales como el virus de norwalk;
- coronavirusidae tales como coronavirus 229E o OC43 humanos y coronavirus-SDRA;
- filoviridae tales como el virus de ébola;
- flaviviridae tales como el virus de la fiebre amarilla, el virus del Nilo occidental, el virus del dengue, el virus de la hepatitis C;
- 50 - hepadnaviridae tal como el virus de la hepatitis B;
- herpesviridae tales como el virus del herpes simple, el virus del herpes humano 1, 3, 4, 5 o 6;
- ortomixoviridae, tales como los virus de la gripe A, B, C, incluidos, entre otros, los serotipos del virus de la gripe A H1N1, H2N2, H3N2, H5N1, H7N7, H1N2, H9N2, H7N2, H7N3 y N10N7;
- papillomaviridae tales como el papilomavirus humano;
- 55 - paramixoviridae tales como el virus de la parainfluenza humana 1, el virus del sarampión y el virus de las paperas;
- parvoviridae, tales como el virus adenoasociado;
- picornaviridae tales como poliovirus, el virus de la enfermedad pie-boca (incluidos los serotipos O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1);
- 60 - poxviridae tales como el virus vaariolovacunal, el virus variola y el virus de la viruela aviar;
- reoviridae tales como el grupo de virus de la lengua azul;
- retroviridae tales como lentivirus, incluidos los virus de la inmunodeficiencia humana 1 y 2; y
- togaviridae tales como el virus de la rubéola.

65 En una realización preferida, la partícula viral puede ser o puede derivar de un virus adenoviridae, ortomixoviridae, parvoviridae, picomaviridae o poxviridae. En una realización particularmente preferida, la partícula viral puede ser o

puede derivar de un virus adenovirus, virus variolovacunal, virus de la gripe o virus de la enfermedad pie-boca.

Las partículas similares a virus (VLP) incluyen proteínas virales derivadas de las proteínas estructurales de un virus, pero carecen de ácido nucleico viral. Cuando se sobreexpresan, estas proteínas estructurales se autoensamblan de forma espontánea en partículas. Las VLP son incompetentes en la replicación. En algunas realizaciones, las VLP son proteínas virales embebidas dentro de una bicapa lipídica. Ejemplos de VLP incluyen VLP derivadas de fagos, VLP de proteína de la cápsida mayoritaria L1 DE papilomavirus humano (HPV), VLP de la proteína de la cápsida del virus de Norwalk y VLP ensambladas a partir de proteínas estructurales del virus de la gripe tales como la proteína M1, proteína hemaglutinina HA y proteína neuraminidasa N1.

Las partículas virales se pueden preparar usando técnicas estándar bien conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, se puede preparar un virus infectando células huésped cultivadas con la cepa de virus que se va a usar, permitiendo que la infección progrese de modo que el virus se replique en las células cultivadas y se puedan liberar mediante procedimientos estándar conocidos en la técnica para recoger y purificar virus.

Mezcla de conservación

La mezcla de conservación de la presente invención comprende una solución acuosa de uno o más azúcares y una polietilenimina (PEI). Se puede usar cualquier solución acuosa adecuada. La solución se puede tamponar. La solución puede ser una solución de HEPES, solución salina tamponada con fosfato (PBS) o agua pura.

Los azúcares adecuados para usar en la presente invención incluyen azúcares reductores, tales como glucosa, fructosa, gliceraldehídos, lactosa, arabinosa y maltosa; y azúcares no reductoras tales como sacarosa. El azúcar puede ser un monosacárido, disacárido, trisacárido u otros oligosacáridos. El término "azúcar" incluye alcoholes de azúcar.

Se conciben monosacáridos tales como galactosa, rafinosa y manosa; disacáridos tales como lactosa y maltosa; y tetrasacáridos tales como estaquiosa. También son adecuados para usar en la presente invención trehalosa, umbeliferosa, verbascosa, isomaltosa, celobiosa, maltulosa, turanosa, melecitosa y melibiosa. Un alcohol de azúcar adecuado es manitol.

Preferentemente, la solución acuosa de uno, dos o más azúcares es una solución de sacarosa, rafinosa o estaquiosa. En particular, la sacarosa es un disacárido de glucosa y fructosa; la rafinosa es un trisacárido compuesto por galactosa, fructosa y glucosa; y la estaquiosa es un tetrasacárido compuesto por dos unidades de D α -galactosa, una unidad de D α -glucosa y una unidad de D β -fructosa secuencialmente unidos. Se puede emplear una combinación de sacarosa y rafinosa o de sacarosa y estaquiosa.

La conservación de la infectividad viral o de la inmunogenicidad es particularmente eficaz cuando se usan al menos dos azúcares en la mezcla de conservación de la presente invención. Por tanto, la solución de uno o más azúcares comprende una solución de al menos 2, al menos 3, al menos 4 o al menos 5 azúcares. Se han concebido combinaciones de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, etc. azúcares. Preferentemente, la solución de dos o más azúcares comprende sacarosa y rafinosa, o sacarosa y estaquiosa.

PEI es una poliamina alifática que se caracteriza por las unidades químicas de repetición indicadas como $-(CH_2-CH_2-NH)-$. En el presente documento, PEI incluye un homopolímero o copolímero de polietilenimina. El copolímero de polietilenimina puede ser un copolímero aleatorio o de bloque. Por ejemplo, PEI puede consistir en un copolímero de polietilenimina y otro polímero, tal como polietilenglicol (PEG). La polietilenimina puede ser lineal o ramificada.

La referencia a PEI también incluye formas derivadas de una polietilenimina. Una polietilenimina contiene átomos de nitrógeno en varias posiciones. Los átomos de nitrógeno están presentes en grupos amino terminales, por ejemplo R-NH₂, y en grupos internos tales como los grupos que interrumpen un grupo alquilo o alquileno dentro de la estructura polimérica, por ejemplo R-N(H)-R', y en la intersección de una rama polimérica, por ejemplo R-N(-R')-R'', en la que R, R' y R'' pueden ser, por ejemplo grupos de alquilo. Los grupos alquilo o arilo pueden estar unidos a los centros de nitrógeno además de, o en lugar de, átomos de hidrógeno. Dichos grupos alquilo y arilo pueden estar sustituidos o insustituidos. Normalmente, un grupo alquilo sería un grupo alquilo C₁-C₄, por ejemplo metilo, etilo, propilo, isopropilo, butilo, sec-butilo o terc-butilo. Normalmente, el grupo arilo es fenilo.

La PEI puede ser una polietilenimina que está unida covalentemente a una variedad de otros polímeros, tales como polietilenglicol. Se han generado otras versiones modificadas de PEI y algunas están comercialmente disponibles: PEI ramificada de 25 kDa, jetPEI®, PEI de BPM de 5,4 kDa, PEI seudodendrímica, PEI-SS-PEI, PEI-SS-PEG, PEI-g-PEG, PEG-co-PEI, PEG-g-PEI, PEI-co-L lactamida-co-succinamida, PEI-co-N-(2-hidroxi-etil-etilenimina), PEI-co-N-(2-hidroxi-propil)metacrilamida, PEI-g-PCL-PEG de bloque, PEI-SS-PHMPA, PEI-g-dextrano 10 000 y PEI-g-transferina-PEG, Pluronic85®/Pluronic123®-g-PEI.

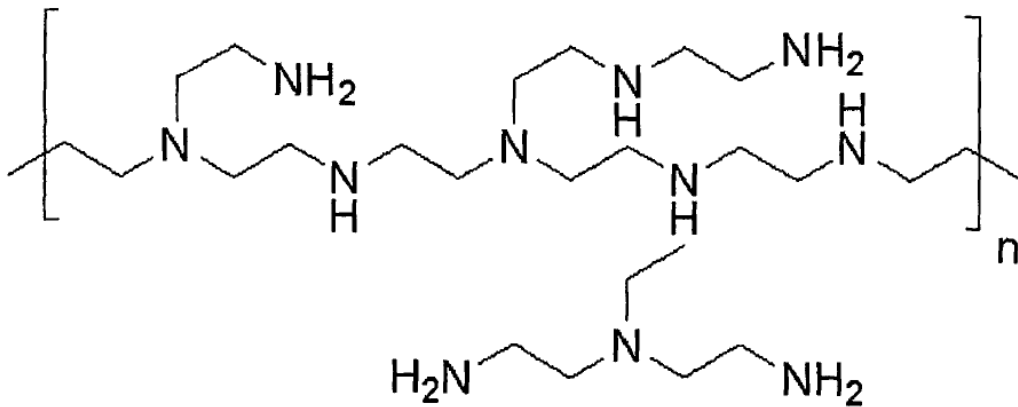
PEI está disponible en un amplio abanico de masas molares promedio en número (Mn), por ejemplo entre 300 Da y 800 kDa. Preferentemente, la masa molar promedio en número está entre 300 y 2000 Da, entre 500 y 1500 Da,

entre 1000 y 1500 Da, entre 10 y 100 kDa, entre 20 y 100 kDa, entre 30 y 100 kDa, entre 40 y 100 kDa, entre 50 y 100 kDa, ENTRE 60 y 100 kDa, entre 50 y 70 kDa o entre 55 y 65 kDa. Una PEI de M_n relativamente alta de aproximadamente 60 kDa o una M_n relativamente baja de 1200 Da es adecuada.

5 Preferentemente, la masa molar promedio en peso (M_p) de PEI está entre 500 Da y 1000 kDa. Más preferentemente, la M_p de la PEI está entre 500 Da y 2000 Da, entre 1000 Da y 1500 Da, o entre 1 y 1000 kDa, entre 100 y 1000 kDa, entre 250 y 1000 kDa, entre 500 y 1000 kDa, entre 600 y 1000 kDa, entre 750 y 1000 kDa, entre 600 y 800 kDa, entre 700 y 800 kDa. Una PEI de M_p relativamente alta de aproximadamente 750 kDa o una M_p relativamente baja de aproximadamente 1300 Da es adecuada.

10 La masa molar promedio en peso (M_p) y la masa molar promedio en número (M_n) de PEI se puede determinar mediante procedimientos bien conocidos para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la M_p se puede determinar mediante dispersión de la luz, dispersión de neutrones de ángulo pequeño (SANS), dispersión de rayos X o velocidad de sedimentación. La M_n se puede determinar mediante, por ejemplo, cromatografía de permeación en gel, procedimientos de viscosimetría (ecuación de Mark-Houwink) y procedimientos de coligación tales como osometría de presión de vapor y titulación de grupos finales.

20 Varias formas de PEI están disponibles comercialmente (p. ej., Sigma, Aldrich). Por ejemplo, una forma de PEI ramificada de peso molecular relativamente alto usada en el presente documento con un M_n de aproximadamente 60 kDa y una M_p de aproximadamente 750 kDa está disponible comercialmente (Sigma P3143). Esta PEI se puede representar con la siguiente fórmula:



25 Una forma de peso molecular relativamente bajo de PEI usada en el presente documento también está disponible comercialmente (p. ej., Aldrich 482595), que tiene una M_p de 1300 Da y una M_n de 1200 Da.

30 En la presente invención, se proporciona una mezcla de conservación que comprende una solución acuosa de PEI y uno, dos o más azúcares. Normalmente, las partículas virales se mezclan con la mezcla de conservación para proporcionar la solución acuosa para desecación.

35 La concentración de azúcar en la solución acuosa para desecación es superior a 0,1M. Preferentemente, la concentración del azúcar en la solución acuosa para desecación o, si hay más de un azúcar presente, la concentración total de azúcar en la solución acuosa para desecación es al menos 0,2M, 0,3M, 0,4M, 0,5M, 0,6M, 0,75M, 0,9M, 1M o 2M hasta saturación, por ejemplo saturación a temperatura ambiente o hasta 3m, 2,5M o 2M. La concentración de azúcar o la concentración total si hay presente más de un azúcar puede ser de 0,5 a 2M. Cuando hay más de un azúcar presente, cada azúcar puede estar presente a una concentración de 0,2M, 0,3M, 0,4M, 0,5M, 0,6M, 0,75M, 0,9M, 1M o 2M hasta saturación, por ejemplo saturación a temperatura ambiente o hasta 3m, 2,5M o 2M.

40 La concentración de PEI en la solución acuosa para desecación está, en general, en el intervalo de menos de 500 nM en base a la M_n . Dichas concentraciones de PEI son particularmente eficaces en la conservación de infectividad viral o inmunogenicidad.

45 En una realización preferida de la invención, la PEI se proporciona a una concentración en base a la M_n de menos de 500 nM, menos de 100 nM, menos de 40 nM, menos de 25 nM, menos de 10 nM, menos de 5 nM, menos de 1 nM, menos de 0,5 nM, menos de 0,25 nM, menos de 0,1 nM, menos de 0,075 nM, menos de 0,05 nM, menos de 0,025 nM o menos de 0,0025 nM. Normalmente, la concentración de PEI basada en la M_n es 0,0025 nM o más, 0,025 nM o más o 0,1 nM o más. Una concentración de PEI adecuada en base a la M_n está entre 0,0025 nM y 200 nM, o entre 0,025 y 200 nM.

Preferentemente, la concentración de PEI en base a la M_p es menos de 5 μM , menos de 1 μM , menos de 0,1 μM , menos de 0,01 μM , menos de 5 nM, menos de 4 nM, menos de 2 nM, menos de 1 nM, menos de 0,5 nM, menos de 0,25 nM, menos de 0,1 nM, menos de 0,05 nM, menos de 0,02 nM, menos de 0,002 nM o menos de 0,1 nM. Normalmente, la concentración de PEI basada en la M_p está entre 0,00001 nM o más, 0,001 nM o más o 0,01 nM o más. Un intervalo de concentración de PEI adecuado en base a la M_p está entre 0,00001 nM y 20 nM, entre 0,001 y 20 nM o entre 0,001 y 5 nM.

Normalmente, se ha encontrado que la PEI de peso molecular relativamente alto es eficaz a concentraciones menores que la PEI de peso molecular relativamente bajo. Por tanto:

- Cuando se usa una PEI de M_p relativamente alta, por ejemplo en el intervalo de 20 a 1000 kDa, se prefiere una concentración de PEI entre 0,001 y 5 nM en base a la M_p . Cuando se usa una PEI de M_p relativamente baja, por ejemplo en el intervalo de 300 a 10 kDa, se prefiere una concentración de PEI entre 0,0001 y 10 μM .
- Cuando se usa una PEI de M_p relativamente alta, por ejemplo en el intervalo de 20 a 1000 kDa, la concentración de PEI basada en la M_n está preferentemente entre 0,001 y 100 nM.

Cuando se usa una M_n relativamente baja, por ejemplo en el intervalo de 1 Da a 10 kDa, se usa una concentración de PEI de al menos 0,0001 μM .

Cuando la solución de uno o más azúcares comprende dos o más azúcares, la concentración más eficaz de PEI dependerá del tipo concreto de azúcar usado en la mezcla de conservación.

Cuando la solución acuosa de dos o más azúcares comprende una solución acuosa de sacarosa y rafinosa y cuando se usa una PEI de peso molecular relativamente alto, por ejemplo entre 10 y 100 kDa en base a la M_n , la concentración de PEI en base a la M_n está entre 0,1 y 100 nM.

Al usar una combinación de dos azúcares en la mezcla de conservación, los presentes inventores han investigado el efecto de diferentes proporciones de concentraciones molares de estos azúcares sobre la conservación de la partícula viral. Las proporciones de la concentración molar específica entre un azúcar y otro eran particularmente eficaces, pero la proporción exacta dependió de los tipos de azúcar usados. Por tanto, en una realización de la invención en la que uno de los dos o más azúcares comprende sacarosa, la concentración de sacarosa respecto al otro azúcar es una proporción de concentraciones molares de entre 3:7 y 9:1, preferentemente a una proporción de al menos 4:6, al menos 50:50, al menos 6:4, al menos 7:3, al menos 8:2 o al menos 9:1. En el caso de sacarosa y estaquilla, una proporción de concentraciones molares de sacarosa:estaquilla de al menos 3:7, al menos 4:6, al menos 50:50, al menos 6:4, al menos 7:3, al menos 8:2 o al menos 9:1 demostró una conservación particularmente eficaz. Preferentemente, la solución de dos o más azúcares comprende una solución de sacarosa y estaquilla a una proporción de concentraciones molares de entre 50:50 y 8:2.

En una realización adicional, la mezcla de conservación de la presente invención comprende una solución acuosa de (i) dos o más azúcares, en la que uno de los azúcares es sacarosa y la concentración de sacarosa respecto a la del otro azúcar es a una proporción de concentraciones molares entre 3:7 y 9:1 y (ii) PEI a una concentración de menos de 100 nM o a una concentración basada en la M_n entre 0,025 y 100 nM..

Conservación

Las técnicas de conservación de la presente invención están particularmente adaptadas a la conservación contra desecación y congelación de partículas virales y exposiciones térmicas. La conservación de partículas virales se consigue mediante desecación de partículas virales mezcladas con la mezcla de conservación de la presente invención. Con la desecación se forma un sólido amorfo. Por "amorfo" se quiere decir "no estructurado" y que tiene una organización observable regular o repetida de moléculas (es decir, no cristalina).

Normalmente, la desecación se consigue mediante desecación por congelación, ultracongelación, desecación al vacío o desecación por aerosol. Se prefiere la desecación por congelación. Eliminando el agua del material y sellando el material en un vial, el material se puede almacenar con facilidad, enviar y reconstituir después a su forma original.

La desecación por liofilización es un proceso de deshidratación normalmente usado para conservar material perecedero o hacer que el material sea más cómodo de transportar. La desecación por desecación representa una etapa clave para fabricar proteínas sólidas y productos farmacéuticos de vacuna. No obstante, los materiales biológicos se someten a tensiones por congelación y desecación durante el procedimiento, que son capaces de desplegar o desnaturalizar proteínas. Adicionalmente, el índice de difusión del vapor de agua desde el material biológico congelado es muy bajo y, por tanto, el procedimiento consume tiempo. La técnica de conservación de la presente invención permite proteger a los materiales biológicos contra la desecación y/ tensiones térmicas del procedimiento de desecación por congelación.

En esta técnica hay tres etapas principales, a saber congelación, desecación primaria y desecación secundaria. Normalmente, la congelación se realiza usando una máquina de desecación por congelación. En esta etapa, es importante enfriar el material biológico por debajo de su punto eutéctico, la temperatura más baja a la que las fases sólida y líquida del material pueden coexistir. Esto asegura que se producirá sublimación en lugar de fusión en la siguiente etapa de desecación primaria. Como alternativa, los materiales amorfos no tienen un punto eutéctico, pero tienen un punto crítico por debajo del cual el producto se debe mantener para evitar la reprofusión o el colapso durante la desecación primaria y secundaria.

Durante la desecación primaria, la presión se disminuye y se suministra bastante calor al material para que el agua se sublime. La cantidad de calor necesaria se puede calcular usando el calor latente de las moléculas de la sublimación. Aproximadamente el 95 % del agua en el material se sublima en esta etapa. La desecación primaria puede ser lenta, ya que demasiado calor podría degradar o alterar la estructura del material biológico. Con el fin de controlar la presión se aplica un vacío parcial que acelera la sublimación. Una cámara de condensación en frío y/o placas condensadoras proporcionan una(s) superficie(a) sobre las que el vapor de agua se resolidifica.

Tras la finalización del proceso de desecación por congelación, normalmente el vacío se rompe con un gas inerte, tal como nitrógeno, antes de sellar el material.

En una realización, la desecación se consigue mediante congelación de la mezcla, tal como ultracongelación. El término "ultracongelación" significa una congelación prácticamente instantáneo como se consigue mediante, por ejemplo, inmersión de un producto en nitrógeno líquido. En algunas realizaciones, se refiere a una etapa de congelación que tarda menos de 1 a 2 segundos en realizarse.

En ciertas realizaciones, la desecación se lleva a cabo usando desecación al vacío a alrededor de 1300 Pa. No obstante, la desecación al vacío no es esencial para la invención y, en otras realizaciones, la mezcla de conservación en contacto con la partícula viral se centrifuga (es decir, desecación rotatoria) o se seca por congelación (como se describe adicionalmente más adelante). De forma ventajosa, el procedimiento de la invención comprende además someter la mezcla de conservación que contiene la partícula viral a un vacío. De forma conveniente, el vacío se aplica a una presión de 20.000 Pa o menos, preferentemente de 10.000 Pa o menos. De forma ventajosa, el vacío se aplica durante un periodo de al menos 10 horas, preferentemente 16 horas o más. Como lo saben los expertos en la técnica, el periodo de aplicación de vacío dependerá del tamaño de la muestra, la maquinaria usada y otros parámetros.

En otra realización, la desecación se consigue mediante desecación por pulverización de las partículas virales mezcladas con la mezcla de conservación de la invención. Esta técnica es bien conocida para los expertos en la técnica e implica un procedimiento de desecación de un líquido introducido en un gas caliente, por ejemplo aire, gas sin oxígeno o nitrógeno. El líquido introducido se pulveriza en una pulverización de gotas. Después, las gotas se secan por contacto con el gas caliente en una cámara de desecación.

Una vez que se ha mezclado con la mezcla de conservación, las muestras se pueden secar hasta varios contenidos de humedad residuales para ofrecer una conservación a largo plazo a temperaturas mayores que la refrigeración, por ejemplo dentro del intervalo de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 45 °C, o menores que las temperaturas de refrigeración, por ejemplo dentro del intervalo de aproximadamente 0 a -70 °C o menores.

Usando el procedimiento de la invención, la mezcla de partículas virales y mezcla de conservación se seca para formar una matriz sólida amorfa. En una realización de la invención, el sólido amorfo se obtiene en forma de un polvo seco. El sólido amorfo puede tomar la forma de partículas de flujo libre.

No obstante, en una realización adicional del procedimiento de la invención, la mezcla que comprende partículas virales se seca sobre un soporte sólido. El soporte sólido puede comprender una perla, un tubo de ensayo, matriz, soporte plástico, placa de microtitulación, microchip (por ejemplo, silicio, silicio-vidrio o chip de oro) o membrana. En otra realización se proporciona un soporte sólido sobre el cual se seca o fija una partícula viral conservada de acuerdo con los procedimientos de la presente invención.

En la invención se puede usar un kit que comprende un excipiente que comprende una solución acuosa de (i) uno o más azúcares y (ii) PEI. Preferentemente, el kit comprende otros excipientes, vehículos o diluyentes adecuados para fines veterinarios o farmacéuticos. También se pueden proporcionar instrucciones para administración. El kit puede también comprender sustancias auxiliares, tales como adyuvantes, agentes de fijación o emulsionantes, agentes de tamponamiento del pH, aditivos potenciadores de gelificación o viscosidad o colores, adecuados para liberar las partículas virales conservadas de la invención en un paciente o célula diana.

La conservación en relación con las partículas virales se refiere a la resistencia de la partícula viral a la degradación física y/o pérdida de la actividad biológica, tal como degradación de ácido nucleico o de proteínas, pérdida de eficiencia en la transducción, pérdida de infectividad viral, pérdida de inmunogenicidad, pérdida de título vírico o pérdida de potencia de vacuna, bajo exposición a las condiciones de desecación, congelación, temperaturas inferiores a 0 °C, inferiores a -5°C, inferiores a -10°C, inferiores a -15°C, inferiores a -20°C o inferiores a -25°C,

desecación por congelación, temperatura ambiente, temperaturas superiores a -10 °C, superiores a -5°C, superiores a 0°C, superiores a 5°C, superiores a 10 °C, superiores a 15 °C, superiores a 20 °C, superiores a 25°C o superiores a 30 °C. Preferentemente, la conservación de acuerdo con la presente invención comprende crioprotección (protección contra los daños por congelación), lioprotección (protección contra desecación) y/o dermoprotección (protección contra temperaturas mayores o menores de 4 °C).

Medición de la conservación de la partícula viral

La conservación de las partículas virales de acuerdo con la presente invención se puede medir mediante la evaluación de parámetros tales como infectividad viral, inmunogenicidad, índices de transfección, título de virus y respuesta de la célula huésped. Dichas técnicas son bien conocidas para los expertos en la técnica.

Los expertos en la técnica conocen los procedimientos de ensayo para determinación de la infectividad viral y/o la inmunogenicidad e incluyen, entre otros, crecimiento de un virus en un cultivo celular, detección del anticuerpo específico de virus en sangre, la capacidad para producir respuestas de linfocitos T y/o B, detección de antígenos virales, detección del ADN o ARN codificado en el virus u observación de partículas virales usando un microscopio.

Además, la presencia de un virus da lugar a cambios morfológicos en la célula huésped, que se pueden medir para dar una indicación de la actividad viral. Los cambios detectables como estos en la célula huésped debido a la infección viral se conocen como efecto citopático. Los efectos citopáticos pueden consistir en redondeo, desorientación, hinchamiento o encogimiento, muerte y desprendimiento de la superficie. Muchos virus inducen apoptosis (muerte celular programada) en células infectadas, medible mediante técnicas tales como ensayo TUNEL (marcado del extremo libre con desoxinucleotidiluridina transferasa terminal) y otras técnicas bien conocidas para los expertos en la técnica.

Los virus pueden afectar también a la regulación de la expresión de los genes de la célula huésped y estos genes se pueden analizar para dar una indicación de si hay presente actividad viral o no. Dichas técnicas pueden implicar la adición de reactivos al cultivo celular para completar una reacción enzimática o reacción química con un producto de expresión viral. Además, el genoma viral se puede modificar con el fin de potenciar la detección de infectividad viral. Por ejemplo, el genoma viral se puede modificar genéticamente para expresar un marcador que se puede detectar fácilmente mediante microscopía de contraste de fase, microscopía de fluorescencia o mediante radioimagen. El marcador puede expresar una proteína fluorescente expresada tal como GFP (proteína fluorescente verde) o una enzima expresada que puede estar implicada en una reacción colorimétrica o radiomarcaje. El marcador podría ser también un producto génico que interrumpe o inhibe una función concreta de las células analizadas.

Para medir la infectividad viral e indicar el título viral se puede usar un ensayo para unidades formadoras de placas. En este ensayo, las células huésped adecuadas se cultivan sobre una superficie plana hasta que forman una monocapa de células que cubre una placa o frasco de plástico. La selección de una célula huésped concreta dependerá del tipo de virus. Ejemplos de células huésped adecuadas incluyen, entre otras, células CHO, BHK, MOCK, 10T1/2, WEHI, COS, BSC 1, BSC 40, BMT 10, VERa, W138, MRC5, A549, HT1 080,293, B-50, 3T3, NIH3T3, HepG2, Saos-2, Huh7, HEK293 y HeLa. La monocapa de células huésped se infecta después con las partículas virales. El medio líquido se sustituye por uno semisólido de modo que cualquiera de las partículas virales producidas como resultado de una infección no se pueda alejar del sitio de su producción. Se produce una placa cuando una partícula viral infecta una célula, se duplica y, después, mata la célula. Una placa se refiere a un área de células en la monocapa que muestra un efecto citopático, por ejemplo, que, al microscopio, aparece redondo y más oscuro que otras células o, cuando se visualiza a ojo, en forma de manchas de color blanco; el centro de la placa puede carecer de células debido a la lisis inducida por el virus. El virus recién replicado infecta a las células que le rodean y también las mata. Este proceso se puede repetir varias veces. A continuación, las células se tiñen con un colorante, tal como azul de metileno, que sólo tiñe las células vivas. Las células muertas en la placa no se tiñen y aparecen como zonas sin teñir sobre un fondo coloreado.

Cada placa es el resultado de la infección de una célula por un virus, seguido de replicación y propagación de dicho virus. No obstante, los virus que no matan células pueden no producir placas. Una placa se refiere a un área de células en una monocapa que muestra un efecto citopático, por ejemplo, que, al microscopio, aparece redondo y más oscuro que otras células o, cuando se visualiza a ojo, en forma de manchas de color blanco; el centro de la placa puede carecer de células debido a la lisis inducida por el virus. Una indicación del título viral se proporciona midiendo las "unidades formadoras de placas" (UFP). UFP se refiere a un virus, o grupo de virus, que produce una placa. Por ejemplo: Si una solución madre viral tiene 1000 ufp/ml significa que cada ml de esta solución madre tiene 1000 partículas de virus que pueden formar placas. Los niveles de infectividad viral se pueden medir en una muestra de material biológico conservado de acuerdo con la presente invención y comparar con las muestras control, tal como muestras o virus recién obtenidos sometidos a desecación y/o a variación térmica sin la adición de la mezcla de conservación de la presente invención.

Normalmente, el título viral tras la conservación de acuerdo con la presente invención e incubación del producto resultante a 37 °C durante 5 días es al menos el 10 %, al menos el 20 %, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 % o al menos el 90 % del título del virus antes

de dicha incubación o, de hecho, antes de la conservación de acuerdo con la presente invención y dicha incubación.

Algunos tipos de partículas virales de la invención, tal como proteínas virales, VLP o algunos virus inactivados no tienen la capacidad para formar placas en el ensayo de placas. En este caso, la conservación se puede medir mediante otros procedimientos, tales como procedimientos para determinar la inmunogenicidad que son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por ejemplo, en la técnica se conocen ensayos in vivo e in vitro para medir las respuestas inmunitarias del huésped de tipo anticuerpos o mediada por células y son adecuados para usar en la presente invención. Por ejemplo, una respuesta inmunitaria basada en anticuerpos se puede medir comparando la cantidad, avidez y distribución de los isotipos de los anticuerpos en suero en un modelo de animales, antes y después de la inmunización usando la partícula viral conservada de la invención.

Usos de las partículas virales conservadas de la invención

Vacunas

Las partículas virales conservadas de la presente invención pueden encontrara utilidad como una vacuna. Por ejemplo, las partículas virales conservadas, tales como virus enteros muertos, virus vivos atenuados, virus químicamente inactivados, VLP o vectores virales vivos, son adecuados para usar como una vacuna. Como una vacuna, las partículas virales conservadas de la invención se pueden usar como antígenos o para codificar antígenos, tales como proteínas virales para el tratamiento o prevención de una serie de afecciones, incluidos, entre otros, infección viral secuelas de una infección viral, incluyendo, entre otras, toxicidad inducida por el virus, cáncer y alergias. Dichos antígenos contienen uno o más epítomos que estimularán el sistema inmunitario de un huésped para generar una respuesta humoral y/o celular específica de antígeno.

La vacuna conservada de la invención se puede usar para tratar la infección por virus, tales como virus del papiloma humano (HPV), VIH, HSV2/HSV1, virus de la gripe (tipos A, B y C), virus de parainfluenza, poliovirus, virus RSV, rinovirus, rotavirus, virus de la hepatitis A, virus de Norwalk, enterovirus, astrovirus, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de varicela-zoster, citomegalovirus, virus de Epstein-barr, adenovirus, virus de la rubéola, virus del linfoma de células T humanas de tipo I (HTLV-I), virus de la hepatitis B (VHB), virus de la hepatitis C (VHC), virus de la hepatitis D, poxvirus y virus de la variolovacuna. La vacuna puede usarse adicionalmente para proporcionar una respuesta inmunitaria adecuada contra numerosas enfermedades veterinarias, tales como la enfermedad de pie y boca (incluidos los serotipos O, A, C, SAT-1, SAT-2, SAT-3 y Asia-1), coronavirus, el virus de la lengua azul, el virus de la leucemia felina, el virus de la gripe aviar, los virus Hendra y Nipah, pestivirus, parvovirus canino y el virus de la diarrea viral bovina. En una realización, la vacuna es una subunidad, un conjugado o multivalente. Por ejemplo, la vacuna conservada de la invención se puede usar para tratar la infección por dos o más tipos diferentes de virus, tales como los virus del sarampión, las paperas y la rubéola (p. ej., vacuna triple vírica).

Las composiciones de vacuna comprenden partículas virales mezcladas con la mezcla de conservación de la invención que contiene uno o más azúcares y PEI. La composición de la vacuna puede además comprender tampones y aditivos adecuados, tales como antibióticos, adyuvantes u otras moléculas que potencian la presentación de antígenos vacunales a células específicas del sistema inmunológico.

Se pueden usar diversos adyuvantes bien conocidos en la técnica con el fin de incrementar la potencia de la vacuna y/o modular las respuestas inmunitarias humoral y celular. Adyuvantes adecuados incluyen, entre otros, adyuvantes que contienen una emulsión de aceite en agua o adyuvantes de agua en aceite, tales como aceite mineral, adyuvantes basados en aluminio, adyuvantes basados en escualeno/fosfato, adyuvante completo/incompleto de Freund, citoquinas y cualquier otra sustancia que actúe como agente inmunoestimulante para potenciar la eficacia de la vacuna.

La composición de la vacuna puede estar en forma desecada por congelación (liofilizada) con el fin de proporcionar un almacenamiento adecuado y maximizar el periodo de validez de la preparación. Esto permitirá acumular vacuna durante periodos prolongados de tiempo y ayudará a mantener la inmunogenicidad, la potencia y la eficacia. La mezcla de conservación de la presente invención es particularmente adecuada para proteger las sustancias virales contra la desecación y las tensiones térmicas que se encuentran durante los protocolos de desecación por congelación/liofilización. Por tanto, la mezcla de conservación es adecuada para añadir al virus y partícula viral justo después de la recogida y antes de someter a la muestra al procedimiento de desecación por congelación.

Para medir la conservación de una vacuna preparada de acuerdo con la presente invención, se puede medir la potencia de la vacuna usando técnicas bien conocidas para los expertos en la técnica. Por ejemplo, la generación de una respuesta inmunitaria celular o humoral se puede analizar en un modelo animal adecuado monitorizando la generación de anticuerpos o respuestas inmunitarias celulares a la vacuna. La capacidad de las muestras de vacuna preparadas de acuerdo con el procedimiento de la presente invención para desencadenar una respuesta inmunitaria se puede comparar con vacunas no sometidas a la misma técnica de conservación.

Vectores virales

Un virus o vector viral conservado de acuerdo con el procedimiento de la presente invención se puede usar para transferir un gen heterólogo u otra secuencia de ácido nucleico a las células diana. Adecuadamente, la secuencia heteróloga (es decir, el transgen) codifica una proteína o producto génico que es capaz de expresarse en la célula diana. Transgenes adecuados incluyen genes indicadores deseables, genes terapéuticos y genes que codifican polipéptidos inmunogénicos (para usar como vacunas). La terapia génica, un enfoque para el tratamiento o prevención de enfermedades asociadas con la expresión de un gen defectivo, implica la inserción de un gen terapéutico en las células, seguida de la expresión y producción de las proteínas requeridas. Este enfoque permite la sustitución de genes dañados o la inhibición de la expresión de genes no deseados. En particular, el virus o vector viral conservado se pueden usar en terapia génica para transferir a un paciente un transgen terapéutico o gen que codifica polipéptidos inmunogénicos.

En una realización preferida, la partícula viral conservada es un vector viral vivo. Por "vector viral vivo" se quiere decir un vector viral vivo que no es patogénico o tiene una patogenicidad baja por la especie diana y en el que se ha insertado uno o más genes que codifican antígenos que estimulan una respuesta inmunitaria protectora contra otros virus o microorganismos, un gen indicador o una proteína terapéutica. En particular, el ácido nucleico se introduce en el vector viral de un modo tal que todavía puede replicarse, de modo que expresan un polipéptido codificado por la secuencia de ácido nucleico insertada y, en el caso de una vacuna, producir una respuesta inmunitaria en el animal huésped infectado. EN una realización, el vector viral vivo es un vector viral vivo atenuado, es decir está modificado de modo que es menos virulento (causante de enfermedad) que el virus de tipo silvestre.

La base del uso de virus recombinantes como posibles vacunas implica la incorporación de genes específicos de un organismo patógeno en el genoma de un virus no patógeno o atenuado. A continuación, el virus recombinante puede infectar células eucarióticas específicas, in vivo o in vitro, y hacer que expresen la proteína recombinante.

Las vacunas de vectores virales vivos derivadas mediante la inserción de secuencias que codifican genes de organismos productores de enfermedad pueden preferirse a las vacunas con virus vivos atenuados, vacunas inactivadas, enfoques de subunidad o de ADN. Una de las características de seguridad más importantes de vectores virales vivos es que los receptores pueden estar inmunizados contra antígenos específicos de organismos patógenos sin exposición al propio agente de enfermedad. La seguridad se regula adicionalmente mediante la selección de un vector viral que está atenuado para el huésped o es incapaz de replicarse en el huésped aunque sí que lo es de expresar el antígeno heterólogo de interés. Una cepa de vacuna que tiene un historial de seguridad en la especie diana ofrece una característica de seguridad adicional. Se han desarrollado varios sistemas en los que el vector carece de genes esenciales y la preparación de la vacuna se lleva a cabo en sistemas celulares que proporcionan la función perdida.

Se pueden usar diversos vectores, tales como retrovirus, lentivirus, herpesvirus, poxvirus, vectores adenovirus y adenoasociados para la liberación de genes heterólogos en las células diana. El gen heterólogo de interés se puede insertar en el vector viral. Los vectores virales de la invención pueden comprender, por ejemplo, un vector viral provisto de un origen de replicación, opcionalmente un promotor para la expresión del gen heterólogo y opcionalmente un regulador del promotor. Por ejemplo, los adenovirus útiles en la práctica de la presente invención pueden tener deleciones en la región E1 y/o E3 y/o E4, o, de otro modo, se pueden maximizar para recibir ADN heterólogo.

El vector viral puede comprender un promotor constitutivo, Tal como un promotor de citomegalovirus (CMV), un promotor del antígeno t grande de SV40, un promotor LTR del virus de tumor mamario de ratón, el promotor tardío principal del adenovirus (MLP), el promotor LTR del virus de tumor mamario de ratón, el promotor temprano de SV40, los promotores de adenovirus tales como el promotor tardío principal del adenovirus (Ad MLP), los promotores de HSV (tales como los promotores IE del HSV), los promotores del HPV tales como la región reguladora anterior del HPV (URR) o el promotor del virus del sarcoma de rous junto con otras secuencias de ácido nucleico unidas operablemente al gen heterólogo de interés. Los promotores inducibles o específicos de tejido también se pueden usar para controlar la expresión del gen heterólogo de interés. También se pueden seleccionar promotores que sean compatibles con la célula huésped para la que se ha diseñado su expresión.

El vector viral también puede comprender otros elementos moduladores de la transcripción, tales como potenciadores. Los potenciadores se definen ampliamente como un agente de acción cis que, cuando están unidos operablemente a un promotor/secuencia génica, aumentan la transcripción de dicha secuencia génica. Los potenciadores pueden funcionar desde posiciones que están mucho más alejadas de una secuencia de interés que otros elementos de control de la expresión (p. ej., promotores) y pueden funcionar cuando se colocan en cualquier orientación con respecto a la secuencia de interés. Los potenciadores se han identificado a partir de una serie de fuentes virales, incluido virus del poliovirus, virus BK, citomegalovirus (CMV), adenovirus, virus de simio 40 (SV40), virus del sarcoma de molones, virus del papiloma bovino y virus de sarcoma de Rous. Ejemplos e potenciadores adecuados incluyen el potenciador del gen temprano de SV40, el potenciador/promotor derivado de la repetición terminal larga (LTR) del virus del sarcoma de Rous, y elementos derivados del CMV humano o murino, por ejemplo elementos incluidos en la secuencia del intrón A del CMV.

El vector viral que contiene un gen heterólogo de interés puede conservarse después de acuerdo con el procedimiento de la invención antes del almacenamiento, sometiéndolo a posteriores técnicas de conservación, tales como liofilización, o administración a un paciente o célula huésped.

5 En el vector viral de la invención se pueden incluir ácidos nucleicos que codifican polipéptidos conocidos que muestran actividad antiviral, las moléculas inmunomoduladoras tales como citoquinas (p. ej., TNF-alfa, interferones tales como IL-6, y IL-2, interferones, factores estimulantes de colonias, tales como GM-CSF), moléculas auxiliares adyuvantes y coestimuladoras. Como alternativa, dichos polipéptidos se pueden proporcionar por separado, por ejemplo en la mezcla de conservación de la invención, o se pueden administrar de forma simultánea, secuencialmente o por separado, con vectores virales de la invención.

10 Preferentemente, el vector viral conservado de la invención se puede introducir en células huésped adecuadas usando diversas técnicas virales que se conocen en la técnica, tales como, por ejemplo, infección con vectores virales recombinantes, tales como retrovirus, virus del herpes simple y adenovirus. Preferentemente, la administración del presente vector viral de la invención que contiene un gen de interés está mediada por la infección viral de una célula diana.

Se han desarrollado numerosos sistemas basados en virus para transfeccionar células de mamífero.

20 Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico recombinante seleccionado se puede insertar en un vector y empaquetar como partículas retrovirales usando técnicas conocidas en la materia. A continuación, se puede aislar el virus recombinante y liberar a las células del sujeto bien in vivo o bien ex vivo. Los vectores retrovirales se pueden basar en el virus de la leucemia murina Moloney (Mo-MLV). En un vector retroviral, en general, uno o más de los genes virales (gag, pol y env) se sustituyen con el gen de interés.

25 Se conoce una serie de vectores de adenovirus. Normalmente se usan como vectores los adenovirus del subgrupo C, serotipos 2 y 5. El genoma del adenovirus de tipo silvestre es de aproximadamente 35 kb, de los cuales 30 kb se pueden sustituir con ADN extraño.

30 Hay cuatro unidades transcripcionales tempranas (E1, E2, E3 y E4), que tienen funciones reguladoras, y un transcrito tardío, que codifica proteínas estructurales. Los vectores adenovirus pueden tener el gen E1 y/o E3 inactivado. El(los) gen(es) pueden ser suministrados in trans por un virus colaborador, plásmido, o se integrarán en el genoma de una célula colaboradora. Los vectores adenovirus pueden usar un mutante E2a sensible a la temperatura o una delección en E4. El vector adenovirus mínimo puede contener sólo las repeticiones terminales invertidas (ITR) y una secuencia de empaquetamiento alrededor del transgen, siendo todos los genes virales necesarios proporcionados in trans por un virus colaborador. Por tanto, vectores adenovirales adecuados incluyen vectores Ad5 y vectores de adenovirus de simio.

40 Los vectores virales pueden también derivar de la familia poxviridae de virus, entre los que se incluyen los virus variolovacunales y poxvirus aviares, tales como vacunas de la viruela. Por ejemplo, el virus variolovacunal modificado Ankara (MVA) es una cepa del virus variolovacunal que no se replica en la mayoría de los tipos celulares, incluidos los tejidos humanos normales. Por tanto, se puede usar un vector de MVA recombinante para liberar el polipéptido de la invención.

45 También se puede usar la adición de tipos de virus, tales como los virus adenoasociados (AAV) y el virus del herpes simple (HSV), para desarrollar sistemas vectores adecuados.

Excipiente

50 En la presente invención también se proporciona un excipiente para la conservación de partículas virales. El excipiente comprende (a) sacarosa, estaquiosa o rafinosa, o cualquier combinación de las mismas; y (b) PEI a una concentración basada en la M_n de menos de 500 nM. Por "excipiente" se quiere decir una sustancia inactiva usada como vehículo para las partículas virales de la invención (por ejemplo, cuando las partículas virales se usan como vacuna). Normalmente, las partículas virales (p. ej., para usar como vacuna) se disuelven en el excipiente o se mezclan con él, que actúa como conservante de la partícula viral y/o en algunos contextos ayuda a la administración y absorción en el cuerpo. Además de la mezcla de conservación de la presente invención, un excipiente puede también comprender otros conservantes, tales como antioxidantes, lubricantes y aglutinantes bien conocidos en la técnica, siempre que dichos ingredientes no reduzcan significativamente la eficacia de la mezcla de conservación de la presente invención.

Ensayo sobre un soporte sólido

65 Las partículas virales conservadas almacenadas sobre un soporte sólido se pueden usar para fines diagnósticos o para controlar un régimen de vacunación. Por ejemplo, una muestra de un paciente, tal como un fluido corporal (sangre, orina, saliva, flemas, jugos gástricos etc.), se puede conservar de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento secando una mezcla que comprende la mezcla del paciente y la mezcla de conservación

de la presente invención sobre un soporte sólido. A continuación, las muestras conservadas del paciente se pueden analizar para determinar la presencia de antígenos/epítomos virales en la muestra usando anticuerpos antivirales (usando, por ejemplo, ELISA). Como alternativa, las partículas virales de interés se pueden conservar de acuerdo con los procedimientos descritos en el presente documento secando una mezcla que comprende la mezcla del paciente y la mezcla de conservación de la presente invención sobre un soporte sólido. Las muestras de los pacientes se pueden analizar para determinar la presencia de anticuerpos antivirales poniendo en contacto la muestra del paciente con un soporte sólido sobre el cual se fijan las partículas virales de interés. La formación de complejos antígeno-anticuerpo puede provocar una señal mensurable. La presencia y/o la cantidad de complejos antígeno-anticuerpo de la partícula viral en una muestra se pueden usar para indicar la presencia de una infección viral o el progreso de un régimen de vacunación en un paciente.

Administración

Las vacunas o partículas virales conservadas de acuerdo con la presente invención se pueden administrar, en algunos casos tras la reconstitución de un producto desecado por congelación, a un sujeto in vivo usando varias de las vías y técnicas conocidas. Por ejemplo, las vacunas conservadas se pueden proporcionar como solución, suspensión o emulsión inyectables, y administrarse mediante inyección parenteral, subcutánea, oral, epidérmica, intradérmica, intramuscular, interarterial, intraperitoneal, intravenosa, usando una aguja y una jeringuilla convencionales o usando un sistema de inyección a chorro de líquido. Las vacunas conservadas se pueden administrar tópicamente en la piel o el tejido mucoso, tal como por vía nasal, intratraqueal, intestinal, sublingual, rectal o vaginal, o se pueden proporcionar como pulverización finamente dividida adecuada para administración respiratoria o pulmonar.

En una realización, el procedimiento de la invención comprende además la etapa de procesamiento de la mezcla en una formulación adecuada para administrar como inyección de líquido. Preferentemente, el procedimiento comprende además la etapa de procesamiento de la mezcla en una formulación adecuada para administrar mediante ingestión o por vía pulmonar.

El producto conservado se administra a un sujeto en una cantidad que es compatible con la formulación de dosificación y que será profiláctica y/o terapéuticamente eficaz. La administración del producto o vacuna conservado de la invención puede ser para fines "profilácticos" o "terapéuticos". Como se usa en el presente documento, el término "terapéutico" o "tratamiento" incluye cualquiera de los siguientes: la prevención de infección o reinfección; la reducción o eliminación de síntomas; y la reducción o eliminación completa de un patógeno. El tratamiento se puede efectuar profilácticamente (antes de la infección) o terapéuticamente (tras la infección).

Los ejemplos siguientes ilustran la invención. La PEI usada en el Ejemplo , 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 10 tenía una M_p de 750000 y una M_n de 60000 (Sigma P3143). La PEI de "alto peso molecular" usada en el Ejemplo 9 tenía una M_p de 750000 y una M_n de 60000 (Sigma P3143). La PEI de "bajo peso molecular" del Ejemplo 9 tenía una M_p de 1300 y una M_n de 1200 (Aldrich 482595). La histona usada en los Ejemplos era histona 2A obtenida de Boehringer Mannheim.

Se emplearon las siguientes técnicas experimentales generales.

Desecación por pulverización

Después de agitar en vórtex, los viales se congelaron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en bandejas para desecación por congelación que contienen 30 ml de agua con tapones de caucho parcialmente colocados. Los viales congelados se transfirieron a la bandeja con sistema de taponado del liofilizador (Thermo Fisher) o al liofilizador previamente enfriado (Thermo Fisher) y se secaron durante 16 horas. Los tapones Los tapones de caucho se bajaron completamente hasta cerrar los viales al vacío antes de sacarlos del liofilizador.

Ensayo de FMDV

Los virus y las células se cultivaron en medio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de suero bovino fetal, glutamina 20 mM, penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 $\mu\text{g/ml}$). Se preparó medio Eagles para recubrir mediante la adición de 25 ml de indubiosa disuelta en agua (24 mg/ml) hasta 75 nml de recubrimiento de Eagles, 5 ml de caldo trisona fosfato, 1 ml de suero bovino fetal (FBS) y 1 ml de penicilina (100 U/ml) y estreptomina (100 $\mu\text{g/ml}$)

Se prepararon células BHK-21 en placas de cultivo tisular de 6 pocillos y se cultivaron durante la noche a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta una confluencia del 80-90%. Las muestras liofilizadas se resuspendieron en DMEM. Las monocapas de células se lavaron con solución salina tamponada con fosfato (PBS) y se incubaron con 100 μl de muestra de FMDV a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 15 minutos. Las monocapas de células se recubrieron con 2 ml de Eagles de recubrimiento, que se dejó sedimentar a temperatura ambiente (TA) antes de incubar a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 40-48 horas adicionales.

Las monocapas de células infectadas se tiñeron con 2 ml de azul de metileno (4 % de formaldehído en PBS) durante

24 horas a TA y se registraron las placas visualizadas.

Ensayo con adenovirus

5 96 placas de cultivo celular de fondo plano (Jencons, Reino Unido) se sembraron con células HEK 293 células a 10^5 células por ml (100 µl por pocillo) y se mantuvieron a 37 °C con 5 % de CO2. Después de alcanzar una confluencia del 90 %, los viales que contienen el adenovirus más excipiente se reconstituyeron en 1 ml de DMEM más 5% de FBS. Después, se realizó una etapa de dilución de 1:10 tomando 100 ml del vial reconstituido y añadiendo hasta 900 ml de DMEM. Después, a la primera fila de la placa se añadieron 100 ml del virus diluido resultante y se realizó una dilución de 1:2 hacia abajo en la placa. Después, se repitió el procedimiento con el siguiente excipiente. Después de 10 48 horas adicionales, se contó el número de células GFP usando microscopia fluorescente.

Análisis estadístico

15 Se realizó una prueba T de student para analizar la significación entre diferentes excipientes usando el software PRISM Graphpad, versión 4.00. Como alternativa, cuando eran necesarias múltiples comparaciones de pares, se llevó a cabo un ANOVA de una sola vía con una prueba poscomparación de Turkey. Los resúmenes del valor P son *p< 0,10; **p< 0,05 y ***p < 0,005.

20 **Ejemplo 1**

Un adenovirus recombinante que expresa una proteína fluorescente verde (EGFP) con un título de $4,1 \times 10^7$ ufp/ml (por ml de medio de cultivo tisular) se mezcló (1:5, v/v) con un excipiente que comprende sacarosa (una solución saturada, aproximadamente 64 %, p/v), estaquiosa (una solución saturada, aproximadamente 64 % p/v) y PEI (33 µg/ml) a una proporción de 3:1:1 v/v, respectivamente. La mezcla se liofilizó del siguiente modo: Las muestras se congelaron en nitrógeno líquido y se secaron al vacío a temperatura ambiente durante 16 horas. Después de este tiempo, las muestras se almacenaron hasta su uso a -20 °C o se usaron inmediatamente. El adenovirus se analizó usando un ensayo en placas en células 293A. Los resultados se muestran en la Tabla siguiente.

Tratamiento	Título (ufp/ml)
Pre-dsecación	$4,8 \times 10^7$
Inmediatamente después de la desecación	$4,3 \times 10^7$
Tras la desecación y 5 días a 37 °C	$4,1 \times 10^7$

30 **Ejemplo 2**

Este experimento se diseñó para analizar el efecto de los componentes del excipiente sobre la recuperación del FMDV-A cuando se liofilizó (LF) y dejado durante 24 horas a temperatura ambiente (TA) o tratado con calor durante 48 horas a 37 °C (TT). Todos los análisis se prepararon en viales de cristal. Todos los viales se montaron por duplicado.

A cada uno se añadieron 170 µl de una solución acuosa de Sac (1 g/ml) y 30 µl de una solución acuosa de Raf (1 g/ml), dando un volumen total de 200 µl para la mezcla de azúcares. Después, se añadieron 50 µl de PEI (0,03 mg/ml) para completar el excipiente. Por último se añadieron 50 µl de FMDV-A y la mezcla se agitó en vórtex. La concentración final de cada azúcar y de la PEI en la mezcla de excipientes se muestra en la Tabla a continuación:

Componente del excipiente	Concentración final en el excipiente
Sacarosa	1,7 (M)
Rafmosa	0,1 (M)
PE	$6,25 \text{ (nM)}^*/78,13 \text{ (nM)}^1$
*concentración calculada a partir de la M_p	
¹ concentración calculada a partir de la M_n	

Se preparó una mezcla control mediante la adición de 50 µl de FMDV-A a 250 µl de PBS. Los viales se liofilizaron y después se dejaron a TA durante 24 horas o a 37 °C durante 48 horas. Después se realizó un ensayo de FMDV. Los resultados se muestran en la Figura 1. Los resultados demuestran que hay muy poca recuperación de virus cuando el excipiente era solo PBS. El excipiente que contiene Sac, Raf y PEI mostró un recuperación de FMDV similar a TA o con TT. De hecho, una prueba T de Student no mostró diferencias significativas entre la incubación a temperatura ambiente (TA) y tratamiento térmico durante 48 horas a 37 °C (TT).

50 **Ejemplo 3**

Este experimento se diseñó para investigar los beneficios de PEI sobre el virus FMDV-O tratado con calor. Se prepararon viales de vidrio por duplicado con 120 µl de Sac (3M), 80 µl de Estac (0,75M) y 50 µl de PEI (10^{-2} mg/ml) o agua destilada. A cada vial con excipiente se añadieron 50 µl de FMDV-O. La concentración final de cada azúcar y

de PEI, cuando está presente, en la mezcla de excipientes se muestra en la Tabla a continuación:

Componente del excipiente	Concentración final en el excipiente
Sacarosa	1,2 (M)
Estaquiosa	0,2 (M)
PEI	2 (nM)* / 25 (nM) ¹
*concentración calculada a partir de la M _p	
¹ concentración calculada a partir de la M _n	

5 Volúmenes de 50 µl del virus usado también se volvieron a congelar como controles (título original). Después de liofilizar, las muestras se incubaron a 37 °C durante 24 horas o 6 días. Las muestras se resuspendieron en 1 ml de DMEM (más 10 % de FBS) y la recuperación del virus se determinó en el ensayo de placas. Los resultados se muestran en la figura 2.

10 El ejemplo 3 se diseñó para evaluar los beneficios adicionales de la inclusión de PEI en el excipiente de azúcar sobre simplemente tener el excipiente de azúcar solo. Tras el tratamiento térmico a 37 °C durante 24 horas, no se observó un descenso marcado en la recuperación cuando se usó el excipiente que contiene PEI, mientras que la recuperación de virus se redujo significativamente cuando se empleó el excipiente con azúcar sin PEI. Tras 6 días de tratamiento térmico se produjo una pérdida de virus cuando se usó el excipiente que contenía PEI. No obstante, de nuevo, esta pérdida fue significativamente menor que la pérdida cuando se empleó el excipiente que contenía
15 azúcar solo.

Ejemplo 4

20 Las concentraciones iniciales de azúcar se analizaron para optimizar el componente de azúcar del excipiente en la recuperación de FMDV-O. Se preparó una solución de azúcar con una proporción de 120:80 entre Sac (3M) y Estac (0,75M) ("azúcares" y se llevaron a cabo diluciones seriadas de 1:10, 1:100, 1:1000. Se prepararon viales de vidrio por triplicado con 200 µl de cada concentración de azúcar o PBS y a la solución de azúcar o de PBS se añadieron 50 µl de FMDV-O.

25 La concentración final de cada azúcar se muestra en la Tabla siguiente:

Componente del excipiente	Concentración final en el excipiente
Sacarosa	1,2 (M)
Sacarosa 1:10	0,12 (M)
Sacarosa 1:100	0,012 (M)
Sacarosa 1:1000	0,0012 (M)
Estaquiosa	0,2 (M)
Estaquiosa 1:10	0,02 (M)
Estaquiosa 1:100	0,002 (M)
Estaquiosa 1:1000	0,0002 (M)

30 Volúmenes de 50 µl del virus también se volvieron a congelar como controles (título original). Las muestras se liofilizaron, después se incubaron a 37 °C durante 7 días antes de la resuspensión en 1 ml de DMEM (más 10 % de FBS) y la recuperación del virus se determinó en el ensayo de placas. Los resultados se muestran en la figura 3.

El objetivo del Ejemplo 4 era ver el efecto de diluir la concentración de azúcar. Tras la liofilización, la recuperación de virus desciende a aproximadamente un décimo del título original en un excipiente que contiene la solución de
35 azúcar. Cuando la concentración de azúcar se diluye a 1:10 no se observa ninguna recuperación significativa.

Ejemplo 5

El ejemplo 5 se diseñó para investigar el efecto de combinaciones óptimas de concentraciones de sacarosa y estaquiosa para recuperar el FDMV-O. Se preparó una serie de proporciones de azúcar desde 80 µl de Sac (3M) y 120 µl de Estaq. (0,75M) hasta 200 µl de Sac y 0 µl de Estaq.

40 Se preparó PEI con una serie de diluciones de 1 mg/ml desde 1:100 a 1:32000. Se preparó His con una serie de diluciones desde 1 mg/ml a 0,625 mg/ml. Se preparó una matriz de muestras con 50 µl de FMDV-O, 200 µl de cada proporción de azúcar y 50 µl de cada dilución de PEI.

45

La concentración final de cada azúcar y de PEI se muestra en la Tabla siguiente:

Componente del excipiente	Concentración final en el excipiente
Sacarosa 80 µl	0,8 (M)
Sacarosa 100 µl	1 (M)
Sacarosa 120 µl	1,2 (M)
Sacarosa 140 µl	1,4 (M)
Sacarosa 160 µl	1,6 (M)
Sacarosa 180 µl	1,8 (M)
Sacarosa 200 µl	2 (M)
Estaquiosa 120 µl	0,3 (M)
Estaquiosa 100 µl	0,25 (M)
Estaquiosa 80 µl	0,2 (M)
Estaquiosa 60 µl	0,15 (M)
Estaquiosa 40 µl	0,1 (M)
Estaquiosa 20 µl	0,05 (M)
PEI 1:100 mg/ml - 1:32000 mg/ml	2 - 0,006 (nM)* / 25 - 0,075 (nM) ¹
Histona 1 mg/ml - 0,0625 mg/ml	0,17-0,01 mg/ml
*concentración calculada a partir de la M _p	
¹ concentración calculada a partir de la M _n	

5 Las muestras se liofilizaron y se incubaron a 37 °C durante 3 días (muestras de PEI) o 24 horas (muestras de His) antes de la resuspensión en 1 ml de DMEM (más 10 % de FBS) y de determinar la recuperación de FMDV en el ensayo de placas. Los resultados se muestran en las figuras 4.1 y 4.2.

10 Se recopilaron los resultados para cada concentración de PEI. Los resultados mostrados en la Figura 4.1 demuestran que se observó una recuperación significativamente menor al usar un excipiente de sólo sacarosa en comparación con un excipiente que contenía una proporción de 140:60 de Sac:Estaq. Aparte de un excipiente de Sac pura, no se observaron diferencias significativas entre las diferentes proporciones de Sac:Estaq.

15 La Figura 4.2 muestra los resultados del mismo experimento en el que se sustituye His por PEI en el excipiente. Los resultados demostraron un efecto sobre las proporciones óptimas de Sac:Estaq., siendo con mucho preferidas las proporciones mayores de Sac y sin efectos perjudiciales detectables de un excipiente con solo Sac. .

Ejemplo 6

20 En este ejemplo se usó un adenovirus con un marcador de GFP para comparar la recuperación de virus con diferentes concentraciones de azúcar/PEI. Se estableció una serie de diferentes proporciones de Sac:Estaq. con un volumen final de 200 µl. Asimismo, a cada vial se añadieron 50 µl de PEI a un intervalo de concentraciones desde 0,1 mg por ml a 0,01 µg por ml. Tras la adición de adenovirus a las diferentes proporciones de Sac:Estaq.:PEI, los viales se congelaron y LF.

25 La concentración final de cada azúcar y de PEI se muestra en la Tabla siguiente:

Componente del excipiente	Concentración final en el excipiente
Sacarosa 200 µl	2 (M)
Sacarosa 160 µl	1,6 (M)
Sacarosa 120 µl	1,2 (M)
Sacarosa 80 µl	0,8 (M)
Sacarosa 40 µl	0,4 (M)
Estaquiosa 40 µl	0,1 (M)
Estaquiosa 80 µl	0,2 (M)
Estaquiosa 120 µl	0,3 (M)
Estaquiosa 160 µl	0,4 (M)
Estaquiosa 200 µl	0,5 (M)
PEI 1:100 mg/ml	20 (nM)* / 250 (nM) ¹
PEI 1:50 mg/ml	4 (nM)* / 50 (nM) ¹
PEI 1:1000 mg/ml	0,2 (nM)* / 2,5 (nM) ¹
PEI 1:10000 mg/ml	0,02 (nM)* / 0,25 (nM) ¹
*concentración calculada a partir de la M _p	
¹ concentración calculada a partir de la M _n	

Tras 24 horas de tratamiento térmico a 37 °C, el excipiente y el virus se reconstituyeron en 1 ml de DMEM (más 10 % de FBS). El título del virus se analizó usando diluciones en serie por 2 en placas de 96 pocillos que contienen una monocapa confluyente al 90 % de 293 células. Los resultados se muestran en la figura 5.

5 En la optimización inicial se analizaron tres variables: la concentración de Sac, la concentración de Estaq. y la concentración de PEI usando una matriz de concentraciones diferentes. Los resultados de la matriz demuestran que tanto la concentración de azúcar como la concentración de PEI pueden tener un efecto pronunciado sobre la recuperación viral. Las concentraciones altas de Estaq, y Sac o concentraciones altas de PEI mostraron ambas niveles bajos de recuperación. La recuperación óptima de virus requirió que hubiera Sac presente. Las muestras que
10 no contenían Sac no mostraron recuperación.

Ejemplo 7

15 El objetivo de este experimento era examinar la concentración de PEI en un excipiente de azúcar con Sac:Estaq. Se estableció una serie de diluciones a 1:10 de PEI para evaluar las concentraciones óptimas de PEI. Del trabajo de optimización de concentraciones de azúcar se escogió una proporción de 120:80 de Sac:Estaq.

La concentración final de cada azúcar y de PEI se muestra en la Tabla siguiente:

Componente del excipiente	Concentración final en el excipiente
Sacarosa	0,8 (M)
Estaquirosa	0,2 (M)
PEI 100 µg/ml	20 (nM)*/250 (nM) ¹
PEI 10 µg/ml	2 (nM)*/25 (nM) ¹
PEI 1 µg/ml	0,2 (nM)*/2,5 (nM) ¹
PEI 0,1 µg/ml	0,02 (nM)*/0,25 (nM) ¹
PEI 0,01 µg/ml	0,002 (nM)*/0,025 (nM) ¹
PEI 0,001 µg/ml	0,0002 (nM)*/0,0025 (nM) ¹
*concentración calculada a partir de la M _p ¹ concentración calculada a partir de la M _n	

20 Tras la liofilización, las muestras se trataron con calor a 37 °C durante 24 horas, después se llevó a cabo el ensayo de adenovirus. Los resultados se muestran en la figura 6.

25 Los resultados demuestran que cuando se usa PEI a las concentraciones más altas se observa poca recuperación de virus. A medida que se diluye la PEI, la recuperación de virus mejora con una concentración óptima de aproximadamente 0,01 µg/ml. La recuperación a esta concentración fue significativamente mayor que la recuperación de virus usando solo excipientes de azúcar. El excipiente que contenía PBS no mostró recuperación de virus.

30 **Ejemplo 8**

Este experimento se diseñó para obtener mayores conocimientos de los diferentes componentes de excipientes sobre la estabilidad del virus durante la liofilización.

35 La concentración final de cada azúcar y de PEI se muestra en la Tabla siguiente:

Excipiente	Concentración final antes de la liofilización
Sacarosa	1,5M
Estaquirosa	0,125M
PEI (10-2)	2nM*/25nM ¹
PEI (10-4)	0,02nM*/0,25nM ¹
*concentración calculada a partir de la M _p ¹ concentración calculada a partir de la M _n	

40 Los viales que contienen excipiente más virus se liofilizaron durante la noche. Tras la liofilización, los viales se incubaron a 37 °C durante 5 días antes de resuspender en 1 ml de DMEM (10 % de FBS). La solución resultante se diluyó después a 1:1000 antes de llevar a cabo una serie de diluciones a 1:2 antes de proceder al ensayo 293. Los resultados se muestran en la figura 7.

Ejemplo 9

45 El ejemplo 9 se diseñó para estudiar las diferencias entre PEI de alto y bajo peso molecular. La PEI de alto peso molecular ("HPEI") tiene una M_p de 750000, mientras que la PEI de bajo peso molecular ("LPEI") tiene una M_p de

1300.

La concentración final de cada azúcar y de PEI se muestra en la Tabla siguiente:

Excipiente	Concentración final antes de la liofilización
Sacarosa	1,5M
Estaquiosa	0,125M
HPEI (10-2)	2nM*/25nM ¹
HPEI (10-3)	0,2nM*/2,5nM ¹
HPEI (10-4)	0,02nM*/0,25nM ¹
HPEI (10-5)	0,002nM*/0,025nM ¹
LPEI (10-2)	1,28μM*/1,38μM ¹
LPEI (10-3)	0,128μM*/0,138μM ¹
LPEI (10-4)	0,0128μM*/0,0138μM ¹
LPEI (10-5)	0,00128μM*/0,00138μM ¹
*concentración calculada a partir de la M _p ¹ concentración calculada a partir de la M _n	

5 Los viales que contienen excipiente más adenovirus se liofilizaron durante la noche. Tras la liofilización, los viales se incubaron a 37 °C durante 5 días antes de resuspender en 1 ml de DMEM (10 % de FBS). La solución resultante se diluyó después a 1:1000 antes de llevar a cabo una serie de diluciones a 1:2 antes de usar al ensayo 293- Los resultados se muestran en la figura 8.

10 **Ejemplo 10**

El ejemplo 10 se diseñó para analizar las diferencias en la recuperación de adenovirus cuando se diluyó la PEI (peso molecular alto; M_p 750000) en PBS ("PEIP") o agua ("PEIW").

15 La concentración final de cada azúcar y de PEI se muestra en la Tabla siguiente:

Excipiente	Concentración final antes de la liofilización
Sacarosa	1,5M
Estaquiosa	0,125M
PEI (10-2)	2nM*/25nM ¹
PEI (10-3)	0,2nM*/2,5nM ¹
PEI (10-4)	0,02nM*/0,25nM ¹
PEI (10-5)	0,002nM*/0,025nM ¹
*concentración calculada a partir de la M _p ¹ concentración calculada a partir de la M _n	

20 Los viales que contienen excipiente más virus se liofilizaron durante la noche. Tras la liofilización, los viales se incubaron a 37 °C durante 5 días antes de resuspender en 1 ml de DMEM (10 % de FBS). La solución resultante se diluyó después a 1:1000 antes de llevar a cabo una serie de diluciones a 1:2 antes de pasar al ensayo 293. Los resultados se muestran en la figura 9.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para conservar partículas virales, que comprende:
- 5 (i) proporcionar a una solución acuosa uno o más azúcares, una polietilenimina y las partículas virales en las que la concentración de polietilenimina es inferior a 500 nM en base a la masa molar promedio en número (M_n) de la polietilenimina y la concentración de azúcar o, si hay más de un azúcar presente, la concentración total de azúcar es superior a 0,1M; y
- 10 (ii) secar la solución para formar una matriz sólida amorfa que comprende dichas partículas virales.
2. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la concentración de polietilenimina es:
- (a) entre 0,0025 y 200nM
- (b) entre 0,025 y 200nM, o
- 15 (c) menos de 100nM,
- en base a la masa molar promedio en número (M_n) de la polietilenimina.
3. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la M_n de la polietilenimina está entre 20 y 1000 kDa y la concentración de la polietilenimina está entre 0,001 y 100 nM en base a la M_n .
- 20 4. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 1, en el que la M_n de la polietilenimina está entre 300 y 2000 Da.
- 25 5. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que:
- (a) la concentración del azúcar, o la concentración total del azúcar, está entre 0,5 y 2M, y/o
- (b) el azúcar es sacarosa, estaquiosa, rafinosa o un alcohol de azúcar, y/o
- 30 (c) se usa una solución de dos o más azúcares.
6. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 5, en el que se usa una solución de dos o más azúcares y la concentración de sacarosa respecto al otro azúcar está en una proporción de entre 3:7 y 9:1, y la concentración de polietilenimina en base a la M_n en la etapa (i) está entre 0,0025 nM y 100 nM.
- 35 7. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la mezcla se liofiliza.
8. El procedimiento de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las partículas virales están compuestas por un virus vivo o un virus muerto.
- 40 9. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 8, en el que el virus vivo es virus entero o virus vivo atenuado.
10. Un excipiente para la conservación de partículas virales, que comprende:
- (a) sacarosa, estaquiosa o rafinosa o cualquier combinación de las mismas; y
- 45 (b) polietilenimina a una concentración basada en la M_n inferior a 500nM.
11. Uso de un excipiente de acuerdo con la reivindicación 10 para la conservación de una partícula viral durante y después de la liofilización.
- 50 12. Un kit que comprende el excipiente de acuerdo con la reivindicación 10.
13. Un procedimiento de preparar una vacuna que comprende partículas virales, en el que el procedimiento comprende:
- 55 (a) proporcionar a una solución acuosa uno o más azúcares, una polietilenimina y las partículas virales en las que la concentración de polietilenimina es inferior a 500 nM en base a la masa molar promedio en número (M_n) de la polietilenimina y la concentración de azúcar o, si hay más de un azúcar presente, la concentración total de azúcar es superior a 0,1M; y
- (b) opcionalmente añadir un adyuvante, tampón, antibiótico y/o aditivo a la mezcla; y
- 60 (c) secar la solución para formar una matriz sólida amorfa que comprende dichas partículas virales.
14. El procedimiento de acuerdo con la reivindicación 13, en la que la vacuna es una vacuna multivalente.
- 65 15. Un polvo seco que comprende partículas virales conservadas obtenible mediante el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9.

Figura 1

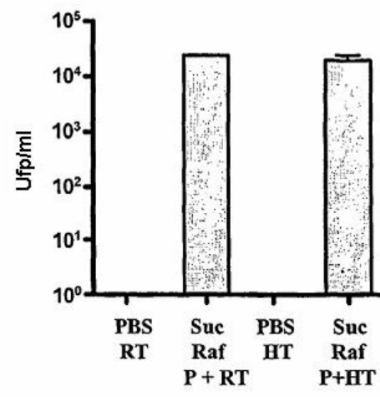


Figura 2

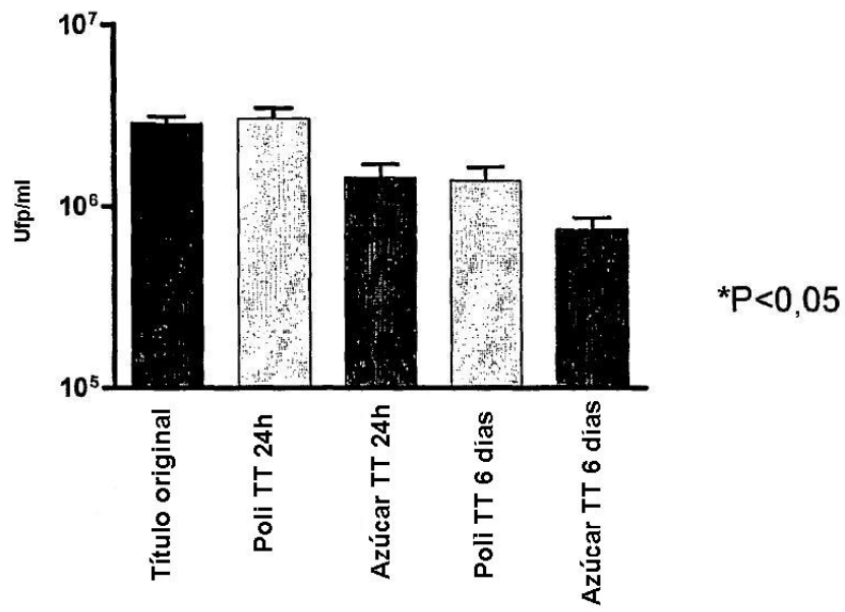


Figura 3

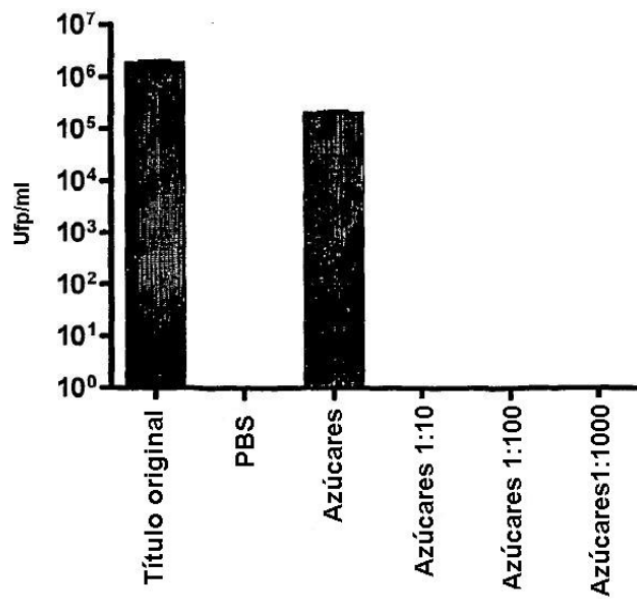


Figura 4.1

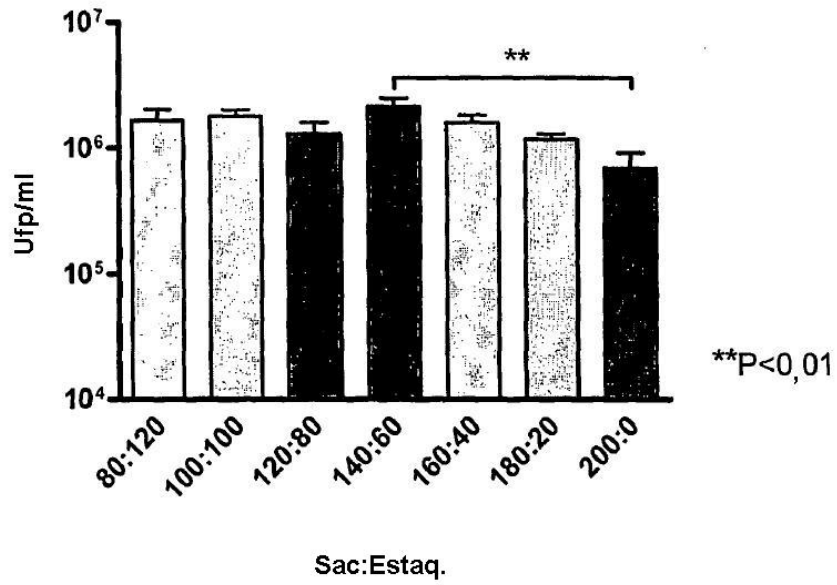


Figura 4.2

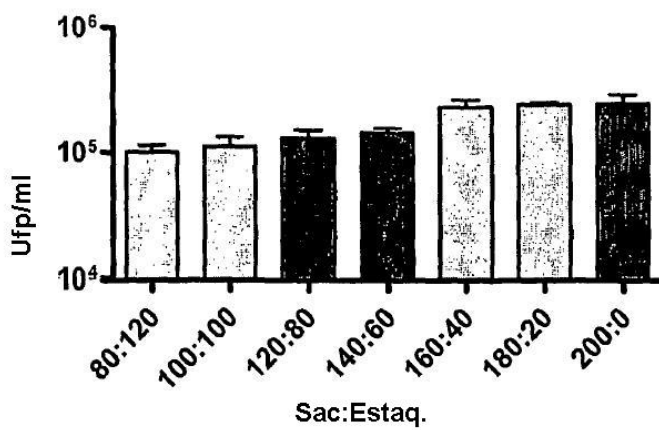


Figura 5

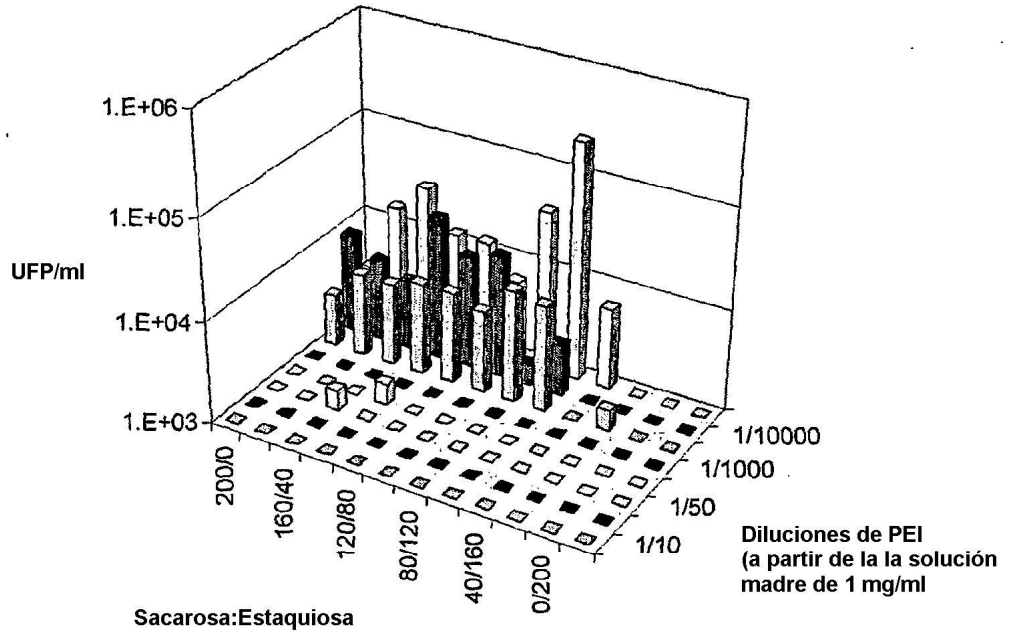


Figure 6

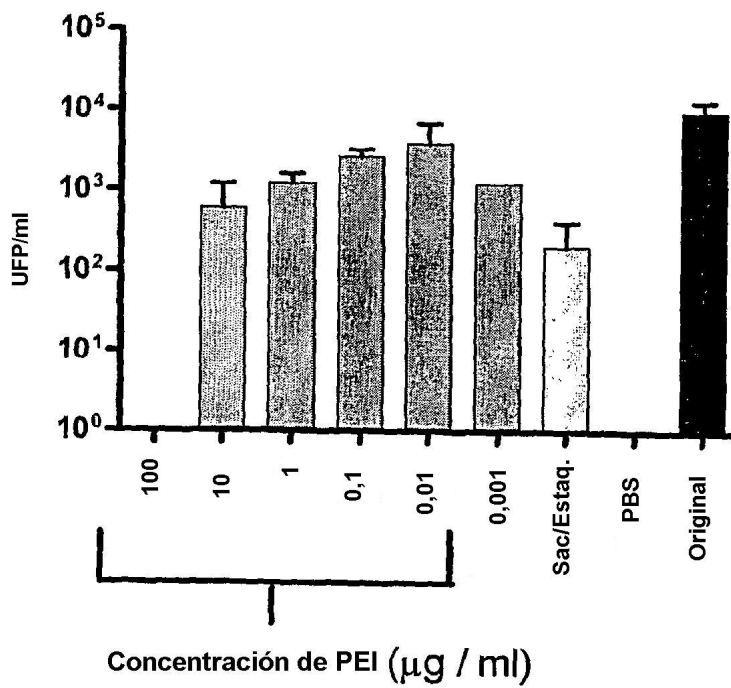


Figura 7

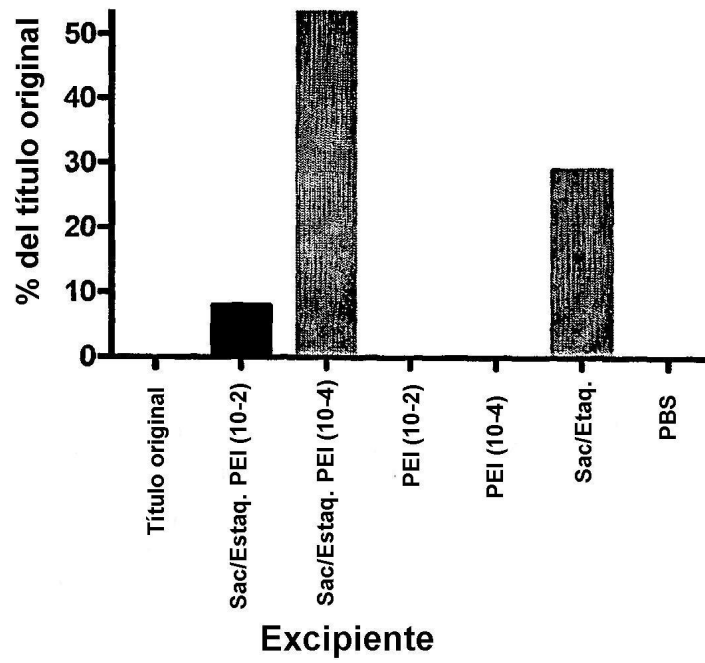


Figura 8

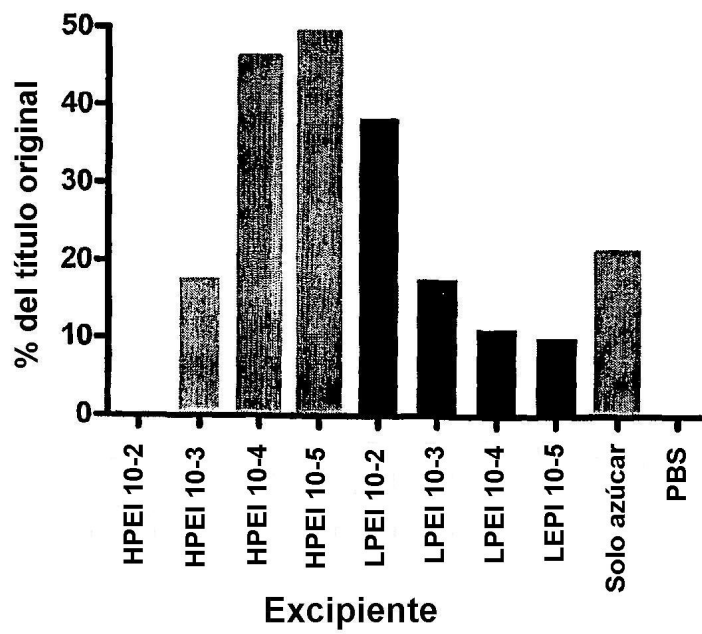


Figura 9

