

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 386 272**

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

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 96 Número de solicitud europea: **10075310 .2**
96 Fecha de presentación: **09.09.2005**
97 Número de publicación de la solicitud: **2236155**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **06.10.2010**

54 Título: **Reducción de riesgos iatrogénicos potenciales asociados a las vacunas antigripales**

30 Prioridad:
09.09.2004 EP 04255471

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.08.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.08.2012

73 Titular/es:
**NOVARTIS VACCINES AND DIAGNOSTICS GMBH
EMIL-VON-BEHRING-STRASSE 76
35041 MARBURG, DE**

72 Inventor/es:
Gregersen, Jens Peter

74 Agente/Representante:
Carpintero López, Mario

ES 2 386 272 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

Reducción de riesgos iatrogénicos potenciales asociados a las vacunas antigripales.

Campo técnico

La presente invención se refiere a la producción y control de calidad de vacunas contra el virus de la gripe.

5 **Antecedentes de la técnica**

Los virus de la gripe para uso en la preparación de vacunas para seres humanos se han desarrollado tradicionalmente en huevos de gallina embrionados, aunque las técnicas más modernas desarrollan el virus en cultivos celulares de mamífero, por ejemplo, en células Vero, células MDCK o células PER.C6. El cambio en el sustrato de crecimiento del virus ha proporcionado una oportunidad para una nueva evaluación reglamentaria de la seguridad de la vacuna antigripal. Por ejemplo, la contaminación con ADN de la célula hospedadora ha sido una objeción reglamentaria en las vacunas obtenidas a partir de células [1], pero no ha sido una objeción en el pasado para las vacunas desarrolladas en huevos.

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

Los principios de seguridad que rodean a las vacunas antigripales obtenidas a partir de huevos son, por lo tanto, diferentes de los que rodean a las vacunas desarrolladas en cultivos celulares, estando las vacunas obtenidas a partir de células bajo una vigilancia más atenta. Es un objeto de la invención abordar estos asuntos de seguridad diferentes, y en particular, el de proporcionar procedimientos para aumentar la seguridad del desarrollo de vacunas antigripales en cultivos celulares.

Divulgación de la invención

Por definición, el uso de sustratos de células de mamífero para la producción de la vacuna antigripal implica el cultivo celular en condiciones que sean perfectamente adecuadas para el desarrollo y la replicación vírica. El inventor ha comprobado que estas condiciones aumentan el riesgo de que puedan desarrollarse patógenos diferentes del virus de la gripe en el cultivo celular, dando lugar, con ello, a la contaminación potencial del producto de vacuna final. Los ensayos de contaminación no son, por lo general, difíciles de llevar a cabo, pero un fabricante debe saber primero qué tipo de ensayos hay que realizar. El inventor ha identificado riesgos de contaminación específicos, y su trabajo indica que pueden llevarse a cabo ensayos adecuados durante la fabricación con el fin de garantizar la seguridad y calidad de las vacunas antigripales desarrolladas en cultivos celulares. Algunos de los contaminantes pueden ser inocuos en un producto de vacuna final, pero su presencia puede interferir con la propagación y purificación posterior del virus de la gripe, de ahí que su eliminación sea un asunto primordial para la calidad y reproducibilidad; otros contaminantes serían perjudiciales en una vacuna final, de ahí que su eliminación sea un asunto de seguridad primordial.

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

El inventor ha identificado agentes infecciosos que pueden desarrollarse en las condiciones usadas para el desarrollo del virus de la gripe en cultivos celulares, pero que no se desarrollan en huevos de gallina. Estos agentes infecciosos representan un nuevo riesgo de contaminación para las vacunas antigripales que nunca ha sido un problema para las vacunas antigripales tradicionales. Por lo tanto, la invención proporciona un procedimiento para la preparación de una vacuna antigripal a partir de virus de la gripe que se desarrolla en un cultivo de una línea de células de mamífero, que comprende una etapa en la cual se ensaya la vacuna y/o el cultivo para determinar la presencia de un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha línea de células, pero que no se desarrolla en huevos de gallina embrionados, en el que dicho agente infeccioso se selecciona del grupo que consiste en: *Pneumovirinae*; *Reoviridae* de mamíferos; *Birnaviridae*; *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae*; *Coronaviridae*; *Rhinovirus* de la familia *Picornaviridae*; virus de Varicella Zoster; virus de polioma BK, virus de polioma JC; virus ECHO; virus Cocksackie de los Enterovirus de la familia *Picornaviridae*; Rotavirus; Picornavirus porcino; Parvovirus; Circovirus y bacterias *Chlamydia*.

El inventor ha identificado igualmente agentes infecciosos que se desarrollan en algunos sustratos de células

usados para la producción de vacuna antigripal pero que no se desarrollan en otros. De acuerdo con ello, estos agentes infecciosos son un riesgo de contaminación únicamente para ciertas vacunas antigripales.

La línea de células de mamífero

5 Las vacunas antigripales de la invención se desarrollan en líneas celulares de mamífero y no en huevos embrionados. Las líneas celulares de mamífero típicas usadas en la producción de productos biológicos son: MDCK; CHO; BHK; Vero; MRC-5; PER.C6; WI-38; etc. Las líneas celulares de mamífero preferidas para el desarrollo de virus de la gripe son: células MD-CK [2-5], obtenidas a partir de riñón canino Madin Darby; células Vero [6-8], obtenidas a partir del mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) o células PER.C6 [9], obtenidas a partir de retinoblastos embrionarios humanos.

10 Estas líneas celulares se encuentran ampliamente disponibles, por ejemplo, en la colección del American Type Cell Culture (ATCC) [10], o en el Coriell Cell Repositories [11]. Por ejemplo, la ATCC suministra diversas células Vero diferentes con los números de catálogo CCL-81, CCL-81.2, CRL-1586 y CRL-1587 y suministra células MDCK con el número de catálogo CCL-34.

15 Además de ser útil por el material obtenido del desarrollo en líneas celulares de mamífero, la invención también puede ampliarse al material derivado del desarrollo en líneas celulares aviares [por ej., ref. 12 y 13], incluidas las líneas celulares derivadas de gallinas, por ejemplo, fibroblastos de embrión de pollo (CEF), etc.

Agentes infecciosos que no se desarrollan en huevos de gallina embrionados

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

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

35 En los casos en los que estos patógenos tienen cepas diferentes con hospedadores diferentes (por ejemplo, RSV humano y RSV bovino), el ensayo incluirá típicamente a las cepa(s) de interés que puedan infectar a humanos.

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

40 **Agentes infecciosos que no se desarrollan en huevos, pero que se desarrollan en diferentes líneas celulares de mamífero**

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

- *Metapneumovirus*, de la familia *Paramyxoviridae*, tal como metapneumovirus humano (HMPV).
- 50 ■ *Rubalavirus* de la familia *Paramyxoviridae*, tal como virus de las paperas, el cual se desarrolla en células Vero.
- *Togaviridae*, tal como *Rubellavirus*.

- *Coronaviridae*, tal como el coronavirus SARS y otros coronavirus humanos. Estos virus muestran altas tasas de desarrollo en células Vero, mostrando el virus SARS desarrollo no limitado, y en consecuencia, el ensayo para estos es de particular importancia.
- *Rhinovirus* de la familia *Picornaviridae*, tales como las cepas M de Rhinovirus.
- 5 ■ Virus de varicella Zoster (VZV), también conocido como virus 2 de herpes humano (HHV3). El VZV puede mostrar desarrollo no limitado en células Vero y, en consecuencia, su ensayo es de particular importancia.
- *Polyomaviridae*, tales como el virus de polioma SV-40, el virus de polioma BK, y el virus de polioma JC. Estos virus de polioma pueden mostrar desarrollo no limitado en células Vero (en particular, en células BK) y, en consecuencia, su ensayo es de particular importancia.
- 10 ■ *Circovirus* porcino.
- *Picornavirus* porcino, tales como el virus de la enfermedad vesicular porcina (SVDV) y el virus Teschen-Talfan.
- Bacterias *Chlamydia*, incluyendo *C. trachomatis*, *C. pneumoniae* y *C. psittaci*. Estas bacterias pueden desarrollarse en células Vero y, en consecuencia, su ensayo es de particular importancia.
- 15 ■ *Parvovirus*, tales como parvovirus canino (CPV) o parvovirus porcino.

En los casos en los que estos patógenos tienen cepas diferentes con hospedadores diferentes (por ejemplo, RSV humano y RSV bovino), el ensayo incluirá típicamente a las cepa(s) de interés que puedan infectar a humanos.

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

Procedimientos de ensayo

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

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

- La referencia 15 divulga un ensayo PCR de transcripción inversa múltiple (RT-PCR), referida como "m-RT-PCR-ELISA", para la detección de nueve patógenos de las vías respiratorias en un único ensayo, concretamente: enterovirus, virus de la gripe tipo A y tipo B, virus sincitial respiratorio, virus de parainfluenza tipo 1 y tipo 3, adenovirus, *Mycoplasma pneumoniae* y *Chlamydia pneumoniae*. En la referencia 16 se divulga un procedimiento RT-PCR para la detección de reovirus de mamífero. La referencia 17 divulga un ensayo RT-PCR en tiempo real para la detección del metaneumovirus humano procedente de todos los linajes genéticos conocidos. La referencia 18 divulga un único ensayo RT-PCR para la detección del virus sincitial respiratorio humano (HRSV), virus de parainfluenza humano 1, 2, y 3 y de la gripe A y B. La referencia 19 divulga un ensayo RT-PCR múltiple para detectar y diferenciar el virus del sarampión, el virus de la rubéola y el parvovirus B19. En la referencia 20 se divulga un ensayo RT-PCR en tiempo real para detectar rinovirus humano con discriminación exacta de otros virus procedentes de la familia *Picornaviridae*. La referencia 21 divulga un ensayo RT-PCR múltiple con conjuntos de cebador anidados dirigidos a regiones conservadas de la hemaglutinina del virus parainfluenza humano, la proteína inoculada de coronavirus humano y los genes de poliproteína de enterovirus y rinovirus humanos, que permite la detección y determinación del tipo de manera rápida, sensible y simultánea de los cuatro tipos de virus parainfluenza (1, 2, 3, 4AB), el coronavirus humano 229E y OC43 y la detección genérica de enterovirus y rinovirus. En la referencia 22 se divulga la detección de SVDV mediante RT-PCR. En la referencia 23 se divulga un ensayo RT-PCR cuantitativo de una sola etapa para el coronavirus SARS. La referencia 24 divulga un ensayo PCR en tiempo real de discriminación alélica TaqMan para el VZV. En la referencia 25 se divulga un ensayo PCR múltiple

para la detección simultánea y rápida de virus de la pseudorrabia, el parvovirus y el circovirus. En la referencia 26 se divulga un ensayo PCR de sonda FRET en tiempo real para la detección del virus de polio SV-40. En la referencia 27 se divulga un ensayo para la detección y diferenciación simultánea del virus de polio humano JC y BK mediante un procedimiento PCR-ELAHA rápido y sensible. En la referencia 28 se divulga la detección de circovirus porcino en líneas celulares humanas mediante PCR y ensayos de inmunofluorescencia indirecta. En las referencias 29 y 30 se divulgan procedimientos PCR para la detección de birnavirus.

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

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

También se prefiere que la vacuna se haya desarrollado en un cultivo sin la adición de material bovino, garantizando, de esta forma, que el cultivo está libre de cualquier contaminación posible de BSE y de virus bovinos. Los medios que no incluyen componentes asociados con ninguna encefalopatía espongiiforme transmisible son los preferidos.

La vacuna antigripal

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

Las vacunas antigripales de la invención pueden estar basadas en cualquier cepa(s) adecuada. Típicamente, las vacunas incluyen antígenos de al menos una cepa de virus de la gripe A y/o al menos una cepa de virus de la gripe B. Las cepas recomendadas para vacunas cambian de una temporada a otra. En el período interpandémico actual, típicamente, las vacunas incluyen típicamente dos cepas de virus de la gripe A (H1N1 y H3N2) y una cepa de virus de la gripe B, y se prefieren las vacunas trivalentes. La invención es también adecuada para la preparación de virus a partir de cepas pandémicas, tales como las cepas H5 o H7, es decir cepas a las cuales la población humana no ha sido inmunológicamente expuesta. Las vacunas en situaciones pandémicas pueden ser monovalentes, o pueden estar basadas en una vacuna trivalente normal suplementada con una cepa pandémica.

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

En los casos en los que una vacuna incluye más de una cepa del virus de la gripe, típicamente, las diferentes cepas se desarrollan por separado y se mezclan después de que los virus se han recolectado y se han preparado los antígenos. Por lo tanto, los procedimientos de la invención pueden incluir la etapa de mezclado de antígenos procedentes de más de una cepa de virus de la gripe. El ensayo para patógenos puede llevarse a cabo antes o después de dicha mezcla.

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

Las vacunas preparadas de acuerdo con la invención pueden usarse para tratar tanto a niños como a adultos. Las vacunas antigripales se recomiendan actualmente para uso en inmunización pediátrica y de adultos, a partir de la edad de 6 meses. Las exigencias de seguridad son más elevadas para las vacunas pediátricas, particularmente

debido a que los sujetos inmunológicamente no expuestos reciben, típicamente, dos dosis de vacunas en un corto período de tiempo (por ejemplo, con 1 a 2 meses de intervalo).

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

La hemaglutinina (HA) es el inmunógeno principal en las vacunas antigripales inactivadas y las dosis de vacuna están normalizadas con referencia a las concentraciones de HA, típicamente medidas mediante un ensayo de inmunodifusión radial único (SRID). Típicamente, las vacunas contienen aproximadamente 15 µg de HA por cepa, aunque también se usan dosis más bajas, por ejemplo, para niños, o en situaciones pandémicas. Se han usado dosis fraccionadas tales como 1/2 (es decir, 7,5 µg de HA por cepa), 1/4 y 1/8 [40,53]. Por lo tanto, las vacunas pueden incluir entre 1 y 20 µg de HA por cepa de virus de la gripe, preferiblemente, por ejemplo, aproximadamente 15, aproximadamente 10, aproximadamente 7,5, aproximadamente 5, aproximadamente 3,8, aproximadamente 1,9, etc.

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

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

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

Agentes accidentales preferidos para ensayo

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

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

En los casos en los que una vacuna ha sido tratada con detergente (por ejemplo, una vacuna fraccionada o una subunidad de vacuna), entonces esta etapa de tratamiento ofrece un grado de seguridad extra, puesto que puede también destruir los virus contaminantes. Sin embargo, si el contaminante no tiene envuelta, entonces, el tratamiento con detergente habitualmente no tendrá efecto sobre la vacuna y, por tanto, no mejora por sí mismo la seguridad. Por lo tanto, el ensayo para los patógenos siguientes es particularmente importante, ya que no tienen envuelta: *Picornaviridae*, *Reoviridae*, *Birnaviridae*, *Parvoviridae*, *Circoviridae*, *Adenoviridae*, *Polyomaviridae*.

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

El ensayo para determinar la presencia de *Reoviridae* de mamíferos es una realización preferida de la invención, dado que: (a) los virus no se desarrollan fácilmente en huevos de gallina y, por lo tanto, el ensayo de los mismos no

5 ha formado parte de la fabricación del virus de la gripe tradicional; (b) los virus pueden mostrar desarrollo no limitado tanto en líneas celulares MDCK como Vero; (c) los virus son altamente resistentes a la inactivación y permanecen estables durante el procesamiento de la vacuna; (d) los virus no tienen envuelta y, por ello, pueden sobrevivir al tratamiento con detergente del virus de la gripe y (e) los virus están implicados en las infecciones respiratorias y, por ello, podrían contaminar aislados víricos iniciales. El ensayo de *Reoviridae* aviar es igualmente importante en los casos en los que se han usado materiales aviares durante la preparación del virus y los criterios (b) a (e) enumerados anteriormente se aplican igualmente a retrovirus aviares.

Generalidades

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

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

La palabra "sustancialmente" no excluye "completamente", por ejemplo, una composición que está "sustancialmente sin" Y puede estar completamente libre de Y. En casos necesarios, la palabra "sustancialmente" puede omitirse de la definición de la invención.

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

Modos para llevar a cabo la invención

20 Células MDCK

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

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

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

40 De entre los virus que podrían desarrollarse en células MDCK, los virus de parainfluenza, el virus del herpes simple y los adenovirus pueden desarrollarse también en huevos de gallina embrionados. Por el contrario, los reovirus humanos (y reovirus de otros mamíferos) no se desarrollan fácilmente en huevos. Si se usa MDCK como un sistema de cultivo celular para la producción de virus de la gripe, entonces, el ensayo de control de calidad debería comprobar la contaminación por reovirus humano. El inventor estima que las concentraciones de reovirus podrían incrementarse en 5 log o más durante pases repetidos en cultivos de suspensión de MDCK, mientras que las concentraciones de un virus, tal como el adenovirus disminuirían en 6 a 10 log. Las concentraciones del virus herpes simple deberían igualmente comprobarse, ya que es posible el desarrollo de HSV en al menos 8 log. De manera similar, se ha observado el desarrollo de PIV-3 en 8 log después de 1 semana de cultivo.

Células Vero

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

Chlamydia.

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

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

REFERENCIAS

- [1] Documento US patent 5948410.
- [2] Documento WO97/37000.
- [3] Brands et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:93-100.
- [4] Halperin et al. (2002) *Vaccine* 20:1240-7.
- [5] Tree et al. (2001) *Vaccine* 19:3444-50.
- [6] Kistner et al. (1998) *Vaccine* 16:960-8.
- [7] Kistner et al. (1999) *Dev Biol Stand* 98:101-110.
- [8] Bruhl et al. (2000) *Vaccine* 19:1149-58.
- [9] Pau et al. (2001) *Vaccine* 19:2716-21.
- [10] <http://www.atcc.org/>
- [11] <http://locus.umdj.edu/>
- [12] Documento WO03/076601.
- [13] Documento WO2005/042728.
- [14] Knipe & Howley *Fields Virology* (4th edition, 2001). ISBN 0-7817-1832-5.
- [15] Puppe et al. (2004) *J Clin Virol* 30:165-74.
- [16] Leary et al. (2002) *J Clin Microbiol* 40:1368-75.
- [17] Maertzdorf et al. (2004) *J Clin Microbiol* 42:981-6.
- [18] Erdman et al. (2003) *J Clin Microbiol* 41:4298-303
- [19] Mosquera Mdel et al. (2002) *J Clin Microbiol* 40:111-6.
- [20] Deffernez et al. (2004) *J Clin Microbiol* 42:3212-3218.
- [21] Coiras et al. (2004) *J Med Virol* 72:484-95.
- [22] Reid et al. (2004) *J Virol Methods* 116:169-76.
- [23] Poon et al. (2004) *J Clin Virol* 30:214-7.
- [24] Campsall et al. (2004) *J Clin Microbiol* 42:1409-13.
- [25] Huang et al. (2004) *Vet Microbiol* 101:209-14.
- [26] Mayall et al. (2003) *J Clin Pathol* 56:728-30.
- [27] Whiley et al. (2004) *J Med Virol* 72:467-72.
- [28] Hattermann et al. (2004) *Xenotransplantation* 11:284-94.
- [29] Novoa et al. (1995) *Vet Res* 26:493-8.
- [30] Blake et al. (1995) *J Clin Microbiol* 33:835-9.
- [31] Documento WO96/15231.
- [32] Huckriede et al. (2003) *Methods Enzymol* 373:74-91.
- [33] Greenbaum et al. (2004) *Vaccine* 22:2566-77.
- [34] Zurbriggen et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:295-304.
- [35] Piascik (2003) *J Am Pharm Assoc (Wash DC)*. 43:728-30.
- [36] Mann et al. (2004) *Vaccine* 22:2425-9.
- [37] Halperin et al. (1979) *Am J Public Health* 69:1247-50.
- [38] Herbert et al. (1979) *J Infect Dis* 140:234-8.
- [39] Chen et al. (2003) *Vaccine* 21:2830-6.
- [40] Hehme et al. (2004) *Virus Res* 103:163-71.
- [41] Documento US patent 6372223.
- [42] Documento US patent 6534065.
- [43] Cooper et al. (2004) *Vaccine* 22:3136-43.
- [44] Frey et al. (2003) *Vaccine* 21:4234-7.
- [45] Bozkir & Hayta (2004) *Drug Target* 12:157-64.
- [46] Guebre-Xabier et al. (2003) *J Virol* 77:5218-25.
- [47] Peppoloni et al. (2003) *Expert Rev Vaccines* 2:285-93.

- [48] Pine et al. (2002) J Control Release 85:263-70.
[49] Baldrige et al. (2000) Vaccine 18:2416-25.
[50] Documento WO94/19013.
5 [51] Documento EP-A-0721782.
[52] Documento US patent 5292506.
[53] Documento WO01/22992.
[54] Banzhoff (2000) Immunology Letters 71:91-96.
[55] WO02/097072.
10 [56] Adamson (1998) Dev Biol Stand 93:89-96.
[57] Vaccines. (eds. Plotkin & Orenstein) 4th edition, 2004. ISBN 0-7216-9688-0.
[58] ATCC catalog information for MDCK (CCL 34).
[59] Goossens et al. (2001) Arthritis Rheum 44: 570-7.
[60] Fallaux et al. (1998) Hum Gene Ther 9:1909-17.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un procedimiento para la preparación de una vacuna antigripal a partir de virus de la gripe que se desarrolla en un cultivo de una línea celular de mamífero, que comprende una etapa en la cual el virus sembrado y/o la vacuna y/o el cultivo se ensaya para determinar la presencia de un agente infeccioso que puede desarrollarse en dicha línea celular, pero que no se desarrolla en huevos de gallina embrionados, en el que dicho agente infeccioso se selecciona del grupo que consiste en: *Pneumovirinae*; *Reoviridae* de mamíferos; *Birnaviridae*; *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae*; *Coronaviridae*; *Rhinovirus* de la familia *Picornaviridae*; virus de Varicella Zoster; virus de polioma BK, virus de polioma JC; virus ECHO; virus Coxsackie de los Enterovirus de la familia *Picornaviridae*; Rotavirus; Picornavirus porcino; Parvovirus; Circovirus y bacterias *Chlamydia*.
- 10 2. Un procedimiento para la preparación de una vacuna antigripal a partir de virus de la gripe que se desarrolla en un cultivo de una línea celular de mamífero, que comprende una etapa en la cual la vacuna y/o el cultivo se trata para eliminar y/o inactivar un agente infeccioso que puede desarrollarse en la línea celular, pero que no se desarrolla en huevos de gallina embrionados, en el que dicho agente infeccioso se selecciona del grupo que consiste en: *Pneumovirinae*; *Reoviridae* de mamíferos; *Birnaviridae*; *Rubulavirus* de la familia *Paramyxoviridae*; *Coronaviridae*; *Rhinovirus* de la familia *Picornaviridae*; virus de Varicella Zoster; virus de polioma BK, virus de polioma JC; virus ECHO; virus Coxsackie de los Enterovirus de la familia *Picornaviridae*; Rotavirus; Picornavirus porcino; Parvovirus; Circovirus y bacterias *Chlamydia*.
- 15 3. El procedimiento de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que la línea celular de mamífero es una línea celular MDCK, una línea celular Vero o una línea celular PER.C6.
- 20 4. El procedimiento de la reivindicación 1, que comprende además una o más de las etapas siguientes: una etapa de inactivación; una etapa de mezclado de tres cepas de virus para obtener una vacuna trivalente; una etapa de formulación de la vacuna para inyección; una etapa de combinación de la vacuna con un adyuvante; una etapa de medición del contenido en HA; una etapa de ajuste del contenido en HA, por ejemplo, por dilución; una etapa de adición de un conservante; una etapa de eliminación de los ácidos nucleicos de la célula hospedadora residuales.
- 25 5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende además una etapa en la que la vacuna y/o el cultivo se ensaya para determinar la presencia de un patógeno seleccionado del grupo que consiste en virus parainfluenza; *Herpesviridae*; *Mycoplasma* y circovirus aviar.
- 30 6. El procedimiento de la reivindicación 2, que comprende además otra etapa en la que después de dicha eliminación y/o inactivación, la vacuna y/o el cultivo se ensaya para determinar la presencia de dicho agente infeccioso.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el cultivo se ensaya mediante detección inmunológica y/o detección de ácido nucleico.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que la detección es mediante ELISA y/o PCR (incluida la RT-PCR).