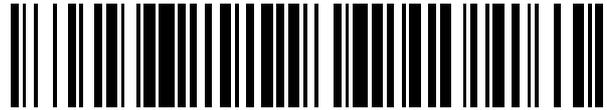


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 423 663**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/285 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.08.2006 E 06851676 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.05.2013 EP 1942932**

54 Título: **Inactivación de patógenos con peróxido de hidrógeno para la producción de vacunas**

30 Prioridad:

08.08.2005 US 706555 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
23.09.2013

73 Titular/es:

**OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY
(100.0%)
OFFICE OF TECHNOLOGY & RESEARCH
COLLABORATIONS 2525 SW FIRST AVENUE
SUITE 120
PORTLAND, OR 97201, US**

72 Inventor/es:

**SLIFKA, MARK K.;
VILLADIEGO, SHIRLEY W.;
HAMMARLUND, ERIKA y
YOSHIHARA, PAUL**

74 Agente/Representante:

TORNER LASALLE, Elisabet

ES 2 423 663 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

Inactivación de patógenos con peróxido de hidrógeno para la producción de vacunas.

Campo

5 La presente divulgación versa acerca del campo de las vacunas. Más específicamente, la divulgación versa acerca de procedimientos para preparar vacunas como se define en las reivindicaciones.

Antecedentes

10 Los procedimientos actuales utilizados para inactivar patógenos vivos en la producción de vacunas implican el uso de agentes químicos tales como formaldehído o betapropiolactona para modificar químicamente el material genético del patógeno. Sin embargo, existen pruebas sustanciales de que ambos agentes son carcinógenos humanos y animales. Por ejemplo, estudios en ratas expuestas a formaldehído mediante inhalación han mostrado que el formaldehído induce carcinomas de células escamosas de la cavidad nasal. Además, se ha mostrado que el formaldehído es genotóxico *in vitro* e *in vivo*. Tanto la genotoxicidad y la citotoxicidad desempeñan un papel importante en la carcinogenicidad del formaldehído.

15 Aunque la concentración de formaldehído en las vacunas es normalmente baja (inferior al 0,02%), esto representa hasta 50-100 microgramos de formaldehído por dosis inyectada en muchas vacunas (por ejemplo, la vacuna contra el ántrax producida por Bioprot Corp. contiene 100 microgramos/ml de formaldehído como un conservante) y supone un riesgo potencial debido al número de vacunaciones que recibe una persona en el curso de su vida. Particularmente peligrosa es la cantidad de formaldehído inyectada en bebés y en niños pequeños en el curso de múltiples vacunaciones rutinarias de su niñez. Aunque la cantidad de formaldehído en cada dosis de vacuna es pequeña, la cantidad combinada puede llegar a ser sustancial.

20 De forma similar, la betapropiolactona, que es utilizada en la inactivación del virus de la rabia, puede producir una reacción inmunitaria compleja cuando se combina con otros componentes de la vacuna de la rabia. Además, se ha mostrado que produce carcinomas, linfomas y hepatomas de células escamosas en ratones.

25 El documento GB933711 da a conocer un procedimiento para la producción de vacunas en el que se atenúa un endoparásito metazoario.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar una alternativa no tóxica de bajo coste al formaldehído y a la betapropiolactona para la inactivación de patógenos vivos, tales como virus. Los procedimientos dados a conocer en el presente documento abordan esta necesidad, y proporcionan beneficios sustanciales no descritos anteriormente en la técnica.

30 Resumen

35 La presente divulgación proporciona procedimientos para producir una composición inmunogénica tal como una vacuna (por ejemplo, procedimientos para preparar un medicamento) que contiene un patógeno viral inactivado, tal como un patógeno viral completo inactivado, como se define en las reivindicaciones. Los procedimientos implican poner en contacto el patógeno viral con una disolución que incluye una cantidad eficaz de un agente oxidante, tal como peróxido de hidrógeno, durante un periodo suficiente como para volver al patógeno viral no infeccioso. Los procedimientos dados a conocer tienen como resultado una composición de vacuna libre de conservante que está sustancialmente libre de peróxido de hidrógeno, sin la necesidad de ninguna etapa intermedia de purificación.

Los procedimientos dados a conocer en el presente documento son adecuados para la preparación de composiciones inmunogénicas (por ejemplo, vacunas) para una amplia variedad de patógenos virales.

40 También se dan a conocer composiciones inmunogénicas, tales como vacunas que contienen un patógeno viral inactivado. Por ejemplo, la composición (o el medicamento) puede ser una composición inmunogénica liofilizada (por ejemplo, una preparación de vacuna) que contiene un patógeno que conserva uno o más epítopos antigénicos predominantes del patógeno viral biológicamente activo a partir del que fue preparada. La composición liofilizada está libre de conservantes y libre de cualquier agente de inactivación. La composición también puede ser un líquido preparado al reconstituir la composición liofilizada en un diluyente farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, la composición puede incluir un adyuvante adecuado que aumenta la eficacia antigénica del antígeno. También se describen procedimientos para suscitar una respuesta inmunitaria en un sujeto al administrar las composiciones que contienen un patógeno viral inactivado.

50 Lo anterior y otros objetos, características, y ventajas de la invención serán más evidentes tras el estudio de la siguiente descripción detallada y de las figuras adjuntas.

Breve descripción de los dibujos

5 La FIG. 1 es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un ELISA que mide la antigenicidad de distintas preparaciones de antígeno del virus vaccinia (VV) en comparación con un virus vivo no tratado. En cada caso, se utilizaron cantidades idénticas de antígeno del virus para revestir la placa ELISA y se utilizó suero humano de un voluntario inmune al virus vaccinia (Dryvax; vacuna viva contra la viruela) para determinar cuán bien podía ser reconocido el antígeno inactivado del virus por el suero inmune al VV. Se muestran los resultados de distintos procedimientos de inactivación de izquierda a derecha: virus vaccinia vivo-sin tratamiento de inactivación; 100 °C durante 10 minutos; 56 °C durante 2 horas; 1% de formaldehído; luz UV-5 julios; luz UV-10 julios; 3% de H₂O₂. Se indica el valor de titulación en el eje Y.

10 La FIG. 2 es un gráfico de líneas que ilustra los resultados de un ELISA que mide anticuerpos específicos contra el virus vaccinia después de la administración de vacunas contra el virus vaccinia preparadas utilizando distintos procedimientos de inactivación (● virus vaccinia (VV) vivo; ○ suero previo a la vacunación; ■ VV inactivado con 1 µg H₂O₂; □ VV inactivado con 0,1 µg H₂O₂; ▲ VV liofilizado inactivado con 1 µg H₂O₂; △ VV liofilizado inactivado con 0,1 µg H₂O₂; ◆ VV dializado inactivado con 1 µg H₂O₂; ◇ VV dializado inactivado con 0,1 µg H₂O₂). Se muestra la puntuación ELISA en el eje Y y los días posteriores a la infección están indicados en el eje X.

15 La FIG. 3 es un gráfico de barras que ilustra la inactivación de un patógeno ejemplar en un amplio intervalo de concentraciones de H₂O₂. La titulación de virus vivo está indicada en el eje Y (ufp/ml) y el % de H₂O₂ está indicado en el eje X.

20 La FIG. 4A es una serie de gráficos de puntos que muestran un análisis de citometría de flujo de subconjuntos de células T CD4+ y CD8+ específicos a antígenos después de la administración de vacunas contra el virus vaccinia preparadas con distintos procedimientos de inactivación (de izquierda a derecha: virus vivo; virus inactivado con H₂O₂; virus inactivado con formaldehído; virus inactivado con calor; y virus inactivado con luz UV). La FIG. 4B es un gráfico de barras que ilustra la medición de titulaciones de anticuerpos neutralizantes específicos para el virus vaccinia (eje Y) después de la administración de vacunas preparadas mediante distintos procedimientos (de izquierda a derecha: inactivadas con H₂O₂; inactivadas con formaldehído; inactivadas con calor; inactivadas con luz UV y virus vivo). La FIG. 4C es un gráfico de barras que ilustra los resultados de un ELISA que detecta anticuerpos específicos contra el virus vaccinia (eje Y) después de la administración de vacunas contra el virus vaccinia preparadas mediante distintos procedimientos (de izquierda a derecha: inactivadas con H₂O₂; inactivadas con formaldehído; inactivadas con calor; inactivadas con luz UV y virus vivo).

30 La FIG. 5A es un gráfico de barras que ilustra la titulación de virus (ufp/ml) de varios patógenos virales inactivados distintos (+) con un 3% de H₂O₂ o sin tratar (-). De izquierda a derecha: virus de coriomeningitis linfocítico (LCMV); virus vaccinia (VV); virus de la viruela del simio (MPV); virus de la fiebre amarilla (YFV); y virus del Nilo occidental (WNV). La FIG. 5B es un gráfico de barras que ilustra la inactivación del LCMV en un amplio intervalo de concentraciones de H₂O₂. La titulación de virus se indica en ufp/ml.

Descripción detallada

35 Introducción

La presente divulgación proporciona procedimientos para producir composiciones inmunogénicas, tales como vacunas, al exponer a los patógenos virales a un agente oxidante, tal como peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno posee una actividad antimicrobiana de amplio espectro, e inactiva de forma eficaz una amplia gama de patógenos, incluyendo los virus, las bacterias, y los parásitos. Normalmente, se han preparado vacunas no replicativas al tratar patógenos vivos con luz ultravioleta (inactivación con luz UV), con calor (inactivación con calor) o mediante una inactivación química con agentes tóxicos y carcinogénicos, tales como formaldehído y betapropiolactona. Aunque se ha utilizado el peróxido de hidrógeno para producir proteína purificada de toxina Pertussis para su uso en vacunas (véase, por ejemplo, Ibsen y otros, Vaccine 14: 359-368, 1996), la utilidad del peróxido de hidrógeno en la producción de composiciones de vacuna a partir de patógenos vivos no ha sido reconocida anteriormente.

La inactivación con un agente oxidante, tal como peróxido de hidrógeno, proporciona varios beneficios significativos en comparación con una inactivación con luz UV, una inactivación con calor o una inactivación con formaldehído o betapropiolactona. El peróxido de hidrógeno es significativamente mejor que cualquiera de los otros procedimientos para el mantenimiento de epítomos inmunogénicos. Por lo tanto, la inactivación con peróxido de hidrógeno produce una composición inmunogénica muy eficaz, tal como una vacuna, que puede ser utilizada para producir una respuesta inmunitaria que es mucho más probable que sea protectora contra una infección subsiguiente por el patógeno vivo que las vacunas producidas utilizando procedimientos que desnaturalizan los epítomos inmunológicamente importantes.

55 A diferencia de otros agentes químicos de inactivación, tales como formaldehído o betapropiolactona, el peróxido de hidrógeno puede ser eliminado sustancialmente o por completo de la composición de la vacuna mediante liofilización. Por lo tanto, una disolución que contiene un patógeno y peróxido de hidrógeno puede ser dispensada en viales estériles y puede ser liofilizada. Durante el procedimiento de liofilización, se elimina el peróxido de hidrógeno

en forma de vapor, dejando tras de sí una composición estable y estéril de vacuna, que puede ser almacenada fácilmente hasta que sea necesaria. Antes de su uso, la vacuna puede ser reconstituida utilizando un diluyente farmacéuticamente aceptable para facilitar la administración mediante medios convencionales de administración. Esto permite la producción de una composición estéril de vacuna que no contiene cantidades dañinas de compuestos tóxicos y carcinogénicos, aumentando de ese modo la seguridad de la vacuna.

Además, después de la inactivación con peróxido de hidrógeno, no existe la necesidad de añadir un conservante (tal como timerosal) a la composición resultante de la vacuna. Se puede mantener la composición estéril durante periodos prolongados de tiempo en el estado liofilizado, haciendo innecesaria la adición de conservantes potencialmente tóxicos. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, las composiciones están sustancialmente o completamente libres de conservantes. Por supuesto, se pueden proporcionar opcionalmente conservantes en la composición.

Por lo tanto, un aspecto de la divulgación versa acerca de un procedimiento para producir una composición inmunogénica, tal como una vacuna (por ejemplo, procedimientos para preparar un medicamento) que incluye un patógeno viral inactivado, como se define en las reivindicaciones. Este procedimiento tiene como resultado la producción de una composición que contiene un patógeno viral inmunológicamente activo no infeccioso. Es decir, el patógeno viral inactivado conserva los epítopos inmunológicos predominantes del patógeno viral infeccioso a partir del cual está producido. Normalmente, el patógeno viral inactivado conserva un epítipo inmunológicamente dominante, o más de uno, que suscita una respuesta inmunitaria protectora contra el patógeno viral. Este procedimiento es adecuado para producir una composición inmunogénica (por ejemplo, una vacuna) que contiene patógenos virales inactivados. Opcionalmente, la composición contiene más de una especie o cepa de patógeno, por ejemplo, la composición es una vacuna combinada. En un ejemplo, la composición puede incluir una pluralidad de virus, por ejemplo, virus de la parotiditis, virus del sarampión y virus de la rubéola. La composición también puede incluir una pluralidad de patógenos seleccionados de distintas clasificaciones (familias) de organismos.

El procedimiento implica poner en contacto el patógeno viral con una disolución que contiene una cantidad eficaz de un agente oxidante, tal como peróxido de hidrógeno (H_2O_2) durante un periodo suficiente como para volver no infeccioso el patógeno viral. Opcionalmente, se purifica o se aísla el patógeno viral antes de ponerlo en contacto con peróxido de hidrógeno. Normalmente, la disolución incluye al menos aproximadamente un 0,1% de peróxido de hidrógeno (p/vol), y puede contener hasta aproximadamente un 30% de peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, la disolución puede incluir aproximadamente un 0,5% de peróxido de hidrógeno, aproximadamente un 1% de peróxido de hidrógeno, aproximadamente un 1,5% de peróxido de hidrógeno, o aproximadamente un 2% de peróxido de hidrógeno. En ciertas realizaciones, la disolución contiene aproximadamente un 3% de peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, las disoluciones con un 3% de peróxido de hidrógeno son fácilmente disponibles en proveedores comerciales, al igual que las disoluciones con un 30%. Por lo tanto, 3% es una concentración conveniente. Sin embargo, por ejemplo, se puede utilizar cualquier concentración entre aproximadamente un 0,1% y un 30%. El tiempo suficiente para inactivar por completo un patógeno viral puede variar entre varios segundos (por ejemplo, diez segundos) y aproximadamente dos horas. Por ejemplo, se puede poner en contacto el patógeno con la disolución de peróxido de hidrógeno durante aproximadamente cinco minutos o aproximadamente 30 minutos o aproximadamente 1 hora. En general, el tiempo suficiente para inactivar el patógeno viral está relacionado inversamente con la concentración de peróxido de hidrógeno en la disolución de inactivación, y puede ser determinado empíricamente por una persona con un nivel normal de dominio de la técnica. La inactivación puede ser llevada a cabo con cualquier temperatura entre la de congelación y la temperatura a la que se desnaturalizan los epítopos inmunológicamente relevantes. Más habitualmente, el procedimiento de inactivación se lleva a cabo a 4 °C o más y por debajo de aproximadamente 42 °C. Por ejemplo, a menudo es conveniente llevar a cabo la inactivación a una temperatura ambiente o a aproximadamente 25 °C.

Entonces, se puede almacenar el patógeno viral inactivado durante periodos prolongados (por ejemplo, durante más de varios meses o más de 1 año). Entonces, la disolución que contiene el patógeno inactivado puede ser administrada directamente a un sujeto con el fin de suscitara una respuesta inmunitaria contra el patógeno, por ejemplo, como una vacuna. Más habitualmente, la disolución que incluye el patógeno inactivado en la presencia de peróxido de hidrógeno es liofilizada para producir una composición inmunogénica. La liofilización elimina parte, la mayoría o incluso todo el peróxido de hidrógeno detectable de la composición de la vacuna y, cuando se desea, produce una composición de vacuna que está sustancialmente libre de peróxido de hidrógeno. La liofilización se puede llevar a cabo esencialmente mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica, siempre que se mantenga la temperatura por debajo de la que se produce una desnaturalización térmica de los epítopos inmunogénicos. Por lo tanto, se puede llevar a cabo la liofilización después de una pre congelación de la disolución de peróxido de hidrógeno/patógeno o sin pre congelación (por ejemplo, a temperaturas ambiente superiores a la congelación, por ejemplo, utilizando un concentrador SPEED-VAC® bajo condiciones que mantienen la temperatura ambiente entre aproximadamente 0 - 4 °C y aproximadamente 42 °C). Para el fin de fabricar composiciones inmunogénicas, tales como vacunas, para la administración a sujetos humanos o animales, la liofilización se lleva a cabo normalmente según procedimientos de fabricación autorizados (GMP) para la producción de vacunas.

Se pueden llevar a cabo la inactivación y la liofilización sin ninguna etapa intermedia de procesamiento, tal como de dilución, de diálisis, de centrifugado, o de purificación. Siempre que se dispense (o se reparta de forma alícuota) la

disolución de patógeno/peróxido de hidrógeno en envases estériles limpios (por ejemplo, viales, ampollas, tubos, etc.) antes de la liofilización, la composición resultante de vacuna es estéril, y no necesita añadirse ningún conservante adicional antes de su administración. Por ejemplo, si se va a administrar la composición de vacuna en una única dosis, simplemente se suspende (o se disuelve) la composición liofilizada de vacuna en un diluyente farmacéuticamente aceptable para producir una composición líquida de vacuna libre de conservantes. En el caso de que se prevea la composición liofilizada de vacuna para múltiples administraciones (por ejemplo, una administración secuencial múltiple a un único sujeto, o una o más administraciones a múltiples sujetos) el diluyente puede incluir un conservante farmacéuticamente aceptable.

La divulgación también versa acerca de composiciones inmunogénicas (por ejemplo, una vacuna) producidas según los procedimientos dados a conocer en el presente documento como se define en las reivindicaciones. Por ejemplo, en una realización, la composición (por ejemplo, el medicamento) es una composición liofilizada que incluye un patógeno viral inactivado que conserva uno o más epítopos antigénicos predominantes del patógeno viral biológicamente activo. Normalmente, la composición está sustancialmente o completamente libre de cualquier conservante o agente de inactivación, tal como formaldehído o betapropiolactona. En otra realización, la composición es un líquido producido al suspender o disolver (solubilizar) la composición liofilizada en un diluyente farmacéuticamente aceptable. Opcionalmente, el diluyente contiene un conservante. Opcionalmente, la composición de vacuna incluye un adyuvante. En forma liofilizada, el adyuvante puede ser, por ejemplo, un adyuvante de aluminio (por ejemplo, alumbre o una sal de aluminio). Tras la preparación de una formulación líquida a partir de la composición liofilizada de vacuna, el adyuvante puede ser una formulación lipídica, por ejemplo, un aceite capaz de formar una emulsión). El patógeno inactivado puede ser un virus, una bacteria, un hongo, o un parásito (por ejemplo, un parásito protozoario).

La divulgación también versa acerca de procedimientos para suscitar una respuesta inmunitaria contra un patógeno viral al administrar las composiciones inmunogénicas. Normalmente, la respuesta inmunitaria es una respuesta inmunitaria protectora que evita o reduce la infección por parte de uno o más patógenos. Por ejemplo, se puede suscitar una respuesta inmunitaria en un sujeto al preparar una composición al poner en contacto un patógeno con una disolución que contiene un agente oxidante tal como peróxido de hidrógeno durante un periodo suficiente como para volver al patógeno no infeccioso; y al administrar la composición a un sujeto, suscitando de ese modo en el sujeto una respuesta inmunitaria (por ejemplo, una respuesta inmunitaria protectora) contra el patógeno. En algunas aplicaciones se administra la disolución a un sujeto sin eliminar el peróxido de hidrógeno de la disolución. En otras aplicaciones, la composición se liofiliza, eliminando parte o la totalidad (o sustancialmente la totalidad) del peróxido de hidrógeno. La composición liofilizada puede ser administrada en forma de polvo (por ejemplo, como un polvo disperso o como un microgranulado, por ejemplo, utilizando un dispositivo de inyección transdérmica de polvo POWDERJECT®). De forma alternativa, se reconstituye la composición liofilizada en un diluyente farmacéuticamente aceptable para su administración utilizando cualquier procedimiento adecuado para administrar una vacuna a un sujeto, por ejemplo, inyección intramuscular, intradérmica, transdérmica, subcutánea o intravenosa, administración oral, o intranasal u otra administración de la composición inmunogénica (por ejemplo, una vacuna) a través de las mucosas.

Términos

A no ser que se explique lo contrario, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado entendido habitualmente por una persona con un nivel normal de dominio de la técnica a la que pertenece la presente divulgación. Se pueden encontrar las definiciones de términos habituales en biología molecular en Benjamin Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew y otros (eds.), The Encyclopedia of Molecular Biology, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Los términos singulares "un", "una", "el" y "la" incluyen referentes plurales, a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. De forma similar, se pretende que la palabra "o" incluya "y", a no ser que el contexto indique claramente lo contrario. Se debe comprender, además, que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o de masa molecular, dados para ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para la descripción. Además, se pretende que las limitaciones numéricas dadas con respecto a concentraciones o niveles de una sustancia, tal como un factor de crecimiento, sean aproximadas. Por lo tanto, cuando se indica que una concentración es de al menos (por ejemplo) 200 pg, se pretende que se comprenda que la concentración es de al menos aproximadamente (o "alrededor de" o "~") 200 pg.

Aunque en la práctica o para someter a ensayo la presente divulgación se pueden utilizar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento, ahora se describen procedimientos y materiales adecuados. El término "comprende" significa "incluye". La abreviatura, "e.g." está derivada del latín *exempli gratia*, y se utiliza en el presente documento para indicar un ejemplo no limitante. Por lo tanto, la abreviatura "e.g." es sinónima con la expresión "por ejemplo".

Para facilitar el estudio de las diversas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de expresiones específicas:

5 Una "composición inmunogénica" o "composición de vacuna" o "vacuna" es una composición de materia adecuada para su administración a un sujeto humano o animal que es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria específica, por ejemplo, contra un patógeno. Como tal, una composición inmunogénica o vacuna incluye uno o más antígenos o epitopos antigénicos. El antígeno puede estar en el contexto de un fragmento aislado de proteína o de péptido de una proteína, o puede ser una preparación parcialmente purificada derivada de un patógeno. De forma alternativa, el antígeno puede estar en el contexto de un patógeno vivo o inactivado completo. Normalmente, cuando una composición inmunogénica o vacuna incluye un patógeno vivo, se atenúa el patógeno, es decir, es incapaz de causar una enfermedad en un sujeto inmunológicamente competente. En otros casos, una composición inmunogénica o vacuna incluye un patógeno inactivado (o matado) completo. El patógeno inactivado puede ser bien un organismo patógeno natural que, de lo contrario (si no estuviese inactivado), causaría una enfermedad en al menos una porción de los sujetos inmunogénicamente competentes, o un aislado o una cepa atenuados o mutantes del patógeno. En el contexto de la presente divulgación, las composiciones inmunogénicas y/o de vacuna contienen un patógeno completo (natural, atenuado o mutante).

10 Una "respuesta inmunitaria" es una respuesta de una célula del sistema inmunitario, tal como una célula B, una célula T, o un monocito, a un estímulo. En algunos casos, una respuesta inmunitaria es una respuesta de una célula T, tal como una respuesta CD4+ o una respuesta CD8+. De forma alternativa, la respuesta es una respuesta de una célula B, y tiene como resultado la producción de anticuerpos específicos. En algunos casos, la respuesta es específica para un antígeno particular (es decir, una "respuesta específica a un antígeno"). Si el antígeno está derivado de un patógeno, la respuesta específica a un antígeno es una "respuesta específica a un patógeno". Una "respuesta inmunitaria protectora" es una respuesta inmunitaria que inhibe una función o actividad perjudicial de un patógeno, reduce la infección por parte de un patógeno, o reduce los síntomas (incluyendo la muerte) que resultan de la infección por parte del patógeno. Se puede medir una respuesta inmunitaria protectora, por ejemplo, mediante la inhibición de una replicación viral o formación de placas en un ensayo de reducción de placas o ensayo ELISA de neutralización, o al medir la resistencia a un reto viral *in vivo*.

20 Una "cantidad inmunológicamente eficaz" es una cantidad de una composición utilizada para suscitar una respuesta inmunitaria en un sujeto. En el contexto de la administración de una vacuna, el resultado deseado es normalmente una respuesta inmunitaria protectora específica a un patógeno. Sin embargo, para obtener una inmunidad protectora contra un patógeno en un sujeto inmunocompetente, normalmente se requieren múltiples administraciones de la composición de vacuna. Por lo tanto, en el contexto de la presente divulgación, la expresión inmunológicamente eficaz abarca una dosis fraccionada que contribuye, en combinación con las administraciones anteriores o subsiguientes, a conseguir una respuesta inmunitaria protectora.

30 Un "antígeno" es un compuesto, una composición, o una sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos y/o una respuesta de una célula T en un animal, incluyendo composiciones que son inyectadas, absorbidas o introducidas de otra manera en un animal. El término "antígeno" incluye todos los epitopos antigénicos relacionados. La expresión "epítipo" o "determinante antigénico" hace referencia a un sitio de un antígeno al que responden las células B y/o T.

40 Los "epítipos antigénicos predominantes" son aquellos epitopos para los que se genera una respuesta inmunitaria del anfitrión funcionalmente significativa, por ejemplo, una respuesta a anticuerpos o una respuesta de las células T. Por lo tanto, con respecto a una respuesta inmunitaria protectora contra un patógeno, los epitopos antigénicos predominantes son aquellos restos antigénicos que cuando son reconocidos por el sistema inmunitario anfitrión tienen como resultado la protección contra la enfermedad causado por el patógeno.

45 Un "adyuvante" es un agente que aumenta la producción de una respuesta inmunitaria de una forma no específica. Los adyuvantes comunes incluyen suspensiones de minerales (alumbre, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio) sobre las que se adsorbe antígeno; o una emulsión de agua-aceite en la que se emulsiona una disolución antigénica en aceite (MF-59, adyuvante incompleto de Freund). Se pueden encontrar detalles adicionales con respecto a diversos adyuvantes en Derek O'Hagan Vaccine Adjuvants: Preparation Methods and Research Protocols (Methods in Molecular Medicine) Humana Press, 2000.

50 La expresión "patógeno completo" hace referencia a un organismo patógeno, tal como un virus, una bacteria, un hongo o un parásito, que incluye todos, o sustancialmente todos, los constituyentes de la forma infecciosa del organismo. Normalmente, un patógeno completo es capaz de una replicación. No obstante, la expresión "patógeno completo" es diferente de la expresión patógeno "natural", y la expresión "patógeno completo" abarca la forma natural, al igual que formas atenuadas y otras formas mutantes del organismo patógeno. Por lo tanto, un patógeno completo puede ser un patógeno atenuado incapaz de causar una enfermedad en un anfitrión inmunocompetente, pero, no obstante, incluye todos, o sustancialmente todos, los constituyentes de un patógeno infeccioso. De forma similar, un patógeno completo puede ser una forma mutante del patógeno, que carezca de uno o más genes (naturales), y/o de proteínas intactos.

Un "patógeno inactivado" es un patógeno completo al que se le ha hecho incapaz de causar una enfermedad (por ejemplo, se ha hecho que se vuelva no infeccioso) por medios artificiales. Normalmente, un patógeno inactivado es un "patógeno matado" que es incapaz de una replicación. Un patógeno es no infeccioso cuando es incapaz de replicarse o incapaz de replicarse hasta niveles suficientes como para causar una enfermedad.

- 5 Un "patógeno inmunológicamente activo" es un patógeno que es capaz de suscitar una respuesta inmunitaria cuando es introducido en un sujeto inmunológicamente competente. La respuesta inmunitaria producida en respuesta a la exposición a un patógeno inmunológicamente activo es idéntica con respecto a los epítomos antigénicos predominantes a la producida por el patógeno infeccioso.

- 10 Un "agente oxidante" es cualquier agente que contribuye oxígeno, extrae hidrógeno, y/o extrae electrones en una reacción. Se puede determinar la potencia de un agente oxidante en función de su potencial electródico estándar, teniendo los agentes oxidantes más potentes el mayor potencial estándar (en voltios). El peróxido de hidrógeno (H₂O₂) es un agente oxidante ejemplar con un potencial electródico estándar de 1,78 voltios.

- 15 Una "disolución que comprende peróxido de hidrógeno" incluye la combinación de cualquier mezcla de un disolvente y de peróxido de hidrógeno, que contienen más que una cantidad traza de peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, una disolución de peróxido de hidrógeno puede incluir un 0,01% de peróxido de hidrógeno, 0,05%, 0,1% o más de peróxido de hidrógeno. Se pueden producir disoluciones que incluyen hasta un 90% o más de peróxido de hidrógeno, pero son muy inestables. Normalmente, las disoluciones de peróxido de hidrógeno disponibles comercialmente no superan aproximadamente un 35% de peróxido de hidrógeno. Más habitualmente, en el contexto de los procedimientos dados a conocer en el presente documento el disolvente es agua, por ejemplo, agua desionizada, o una disolución salina tamponada acuosa. Normalmente, el término disolución incluye disoluciones en fase líquida y disoluciones en fase de vapor que contienen peróxido de hidrógeno. En aras de la coherencia, la proporción de peróxido de hidrógeno en una disolución es dada como peso por volumen (p/vol).
- 20

La frase "sustancialmente libre de peróxido de hidrógeno" indica que no hay presente más que cantidades traza (cantidades detectables empíricamente como de fondo) en la composición.

- 25 El verbo "líoфильizar" significa secar por congelación al vacío. El procedimiento es denominado "líoфильización". En algunos casos, la muestra que va a ser secada (por ejemplo, deshidratada) es congelada antes del secado. En otros casos, el material que va a ser secado es sometido al procedimiento de secado sin un cambio anterior de fase. Durante el procedimiento de líoфильización, la evaporación del disolvente tiene como resultado un enfriamiento de la muestra hasta temperaturas inferiores a la temperatura de fusión de la mezcla de disolvente/soluto, lo que tiene como resultado la congelación de la muestra. Se elimina el disolvente de la muestra congelada mediante sublimación. Un producto que ha sido sometido a líoфильización está "líoфильizado". Según se utiliza en la presente divulgación el término líoфильización también abarca procedimientos funcionalmente equivalentes que aceleran el procedimiento de secado sin exponer a la muestra a un calor excesivo, incluyendo, específicamente: deshidratación por aspersión y líoфильización por aspersión.
- 30

- 35 En el contexto de la presente divulgación "temperatura ambiente" hace referencia a cualquier temperatura dentro de un intervalo de temperaturas entre aproximadamente 16 °C y aproximadamente 25 °C. Habitualmente, la temperatura ambiente es entre aproximadamente 20 °C y 22 °C. En general, se utiliza la expresión temperatura ambiente para indicar que no se gasta energía adicional enfriando (por ejemplo, refrigerando) o calentando la muestra o la temperatura ambiente.

- 40 Un "conservante" es un agente que es añadido a una composición para evitar la descomposición debida a un cambio químico o una acción microbiana. En el contexto de una producción de vacunas, normalmente se añade un conservante para evitar un crecimiento microbiano (por ejemplo, bacteriano o fúngico). El conservante más común utilizado en la producción de vacunas es timerosal, un compuesto orgánico que contiene mercurio. Por lo tanto, la expresión "libre de conservante" indica que no se añade (ni hay presente) ningún conservante a la composición.

- 45 El término "purificación" (por ejemplo, con respecto a un patógeno o una composición que contiene un patógeno) hace referencia al procedimiento de eliminar componentes de una composición cuya presencia no es deseada. La purificación es un término relativo, y no requiere que todas las trazas del componente no deseado sean eliminadas de la composición. En el contexto de la producción de vacunas, la purificación incluye tales procedimientos como la centrifugación, la diálisis, la cromatografía de intercambio iónico, y la cromatografía de exclusión por tamaños, la purificación o precipitación por afinidad.
- 50

- El adjetivo "farmacéuticamente aceptable" indica que el sujeto es fisiológicamente aceptable para ser administrado a un sujeto (por ejemplo, un sujeto humano o animal). Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, 15ª edición (1975), describe composiciones y formulaciones (incluyendo diluyentes) adecuadas para una administración farmacéutica de composiciones terapéuticas y/o profilácticas, incluyendo vacunas.
- 55

En general, la naturaleza del diluyente dependerá del modo particular de administración que se esté empleando. Por ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos

farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, suero fisiológico, disoluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como un vehículo. En ciertas formulaciones (por ejemplo, composiciones sólidas, tales como formas de polvo, de pildora, de comprimido, o de cápsula), no se emplea un diluyente líquido. En tales formulaciones, se pueden utilizar vehículos sólidos no tóxicos, incluyendo por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio.

La frase "procedimiento de fabricación autorizado" o "GMP", con respecto a métodos y procedimientos empleados en la producción de vacunas, hace referencia, específicamente, al conjunto de métodos, de protocolos y de procedimientos establecidos por la United States Food and Drug Administration (FDA). La Organización Mundial de la Salud promulga recomendaciones y directrices similares. La abreviación "cGMP" designa específicamente aquellos protocolos y procedimientos que están autorizados actualmente por la FDA (por ejemplo, según el código 21 de las Normativas Federales, partes 210 y 211, disponible en la red mundial de Internet en fda.gov/cder/dmpq). Los procedimientos acordes con cGMP pueden variar con el paso del tiempo. Se puede adaptar cualquier procedimiento dado a conocer en el presente documento según los nuevos requerimientos de cGMP según ordena la FDA.

15 Inactivación de patógenos virales con peróxido de hidrógeno

Los efectos antimicrobianos del peróxido de hidrógeno han sido bien establecidos desde al menos el principio de la década de 1960, y el peróxido de hidrógeno (por ejemplo, vapor de peróxido de hidrógeno) se utiliza de forma generalizada para descontaminar superficies en aplicaciones de fabricación y médicas/quirúrgicas. No obstante, la utilidad del peróxido de hidrógeno en el contexto de la producción de vacunas no ha sido reconocida anteriormente. La inactivación de patógenos con peróxido de hidrógeno proporciona varias ventajas con respecto a otros procedimientos de producción de vacunas a partir de patógenos vivos. Destacada entre estas es la conservación de epítomos antigénicos. A diferencia de procedimientos que utilizan formaldehído, propiolactona, una irradiación con luz ultravioleta, y/o calor para inactivar los patógenos vivos, la inactivación con peróxido de hidrógeno no tiene como resultado la destrucción (por ejemplo, mediante degradación, alquilación o desnaturalización) de los epítomos antigénicos. Por lo tanto, los procedimientos descritos en el presente documento permiten la producción de composiciones de vacuna que contienen patógenos inactivados que conservan las propiedades inmunológicas del patógeno vivo, proporcionando una composición de vacuna (inmunogénica) más inmunológicamente eficaz.

Aunque ni la irradiación con luz ultravioleta ni la inactivación con calor dejan ningún residuo tóxico ni carcinogénico después de la inactivación, ambas tienen como resultado una desnaturalización significativa de los epítomos antigénicos, reduciendo la eficacia de la preparación antigénica. Además, la irradiación con luz ultravioleta es sumamente sensible a la calidad de la preparación del patógeno, dado que la luz UV es incapaz de penetrar disoluciones densas, especialmente las que contienen materia particulada, tales como agregados de patógenos formados durante el procedimiento de preparación. Esta penetración incompleta hace que el procedimiento sea demasiado poco fiable para una producción rutinaria de vacunas.

Se pueden utilizar formaldehído y propiolactona con resultados coherentes para obtener una inactivación completa de una variedad de patógenos. Sin embargo, ambos agentes dejan tras de sí contaminantes tóxicos y carcinogénicos, que se ha mostrado que son perjudiciales para la salud del ser humano.

Debido a que el peróxido de hidrógeno es bien tolerado por sujetos humanos y animales en pequeñas concentraciones (concentraciones inferiores a aproximadamente un 3% o un 1%, o menos), el patógeno inactivado puede ser administrado directamente a un sujeto (por ejemplo, de forma subcutánea, intraperitoneal o intravenosa) sin un procesamiento adicional sin efectos fisiológicos adversos significativos. De hecho, en algunas aplicaciones en animales, simplemente se administra un patógeno inactivado en la disolución de peróxido de hidrógeno utilizada para inactivar el patógeno.

Aunque los sujetos humanos también toleran bien el peróxido de hidrógeno, existen pruebas de que el peróxido de hidrógeno tiene efectos fisiológicos adversos sobre el crecimiento celular. Por lo tanto, particularmente en aplicaciones que suponen la administración del patógeno viral inactivado a un sujeto humano, normalmente es deseable eliminar de forma sustancialmente completa el peróxido de hidrógeno de la composición de vacuna. Esto puede hacerse de forma sencilla y eficaz al liofilizar la disolución para eliminar el peróxido de hidrógeno. Sin embargo, a diferencia de otros agentes químicos de inactivación, tales como el formaldehído y la propiolactona, no se requieren etapas adicionales de purificación para eliminar el peróxido de hidrógeno antes de un procesamiento subsiguiente, y no queda ningún contaminante tóxico en la composición liofilizada de vacuna si no se lleva a cabo ningún procesamiento adicional para eliminar el agente de inactivación. Esto simplifica mucho la producción de vacunas y el coste de su fabricación. Los procedimientos de liofilización son expuestos con más detalle a continuación en el presente documento. De forma alternativa, se puede eliminar el peróxido de hidrógeno mediante diálisis.

Para fines de administración directa y/o cuando un procesamiento subsiguiente no sigue inmediatamente (en el tiempo) la inactivación, el patógeno viral inactivado puede ser almacenado congelado en la disolución de peróxido de hidrógeno durante periodos prolongados de tiempo (por ejemplo, más de 3 meses, más de 1 año) sin una pérdida de actividad inmunogénica.

Otro beneficio del uso de peróxido de hidrógeno para inactivar patógenos virales es el coste reducido y su facilidad de uso. Hay disponible comercialmente peróxido de hidrógeno de calidad de reactivo de alta calidad como una disolución del 30% (normalmente entre 29 - 32%). Aunque se deben tomar precauciones al almacenar peróxido de hidrógeno a granel, debido a que el peróxido de hidrógeno concentrado es un agente oxidante potente que puede ser inflamable y/o explosivo cuando es puesto en contacto con fuego, un 30% de peróxido de hidrógeno supone poco riesgo al personal cuando es utilizado con un cuidado razonable para evitar la inhalación de grandes cantidades de vapor o un contacto directo con la piel y los ojos. El contacto con la piel, los ojos y el tracto respiratorio puede causar irritación, que puede ser tratada, en general, mediante enjuague o lavado cabal con agua limpia. Cuando se utiliza en concentraciones menores (por ejemplo, a aproximadamente 0,1-10% o menos) el peróxido de hidrógeno supone poco riesgo para la salud.

Aunque se describen las composiciones y los procedimientos dados a conocer en el presente documento con referencia en particular al peróxido de hidrógeno, los expertos en la técnica apreciarán, que también se pueden utilizar otros agentes oxidantes para inactivar patógenos con el fin de producir una composición inmunogénica, tal como vacunas, como se da a conocer en el presente documento. En la Tabla 1 se muestran ejemplos de agentes oxidantes adicionales con sus potenciales electroquímicos estándar. El uso de agentes oxidantes adicionales discurre esencialmente como se describe en el presente documento con respecto al peróxido de hidrógeno, con la excepción de que se toman las precauciones apropiadas para garantizar una manipulación segura del agente oxidante particular. En general, cuando se preparan composiciones inmunogénicas tales como las vacunas, es deseable seleccionar un agente oxidante que produce únicamente agua y un gas difusible como productos. Los ejemplos de tales agentes oxidantes incluyen (además del peróxido de hidrógeno): O₂, O₃, y NO₃⁻. Se apreciará que se pueden utilizar otros agentes oxidantes en la producción de composiciones inmunogénicas, sin embargo, la eliminación de subproductos puede suponer etapas adicionales de procesamiento. Por ejemplo, en ciertos casos el reactivo oxidante produce un subproducto sólido que puede ser eliminado, por ejemplo, mediante filtrado o centrifugado.

Tabla 1: Potenciales electroquímicos estándar de agentes oxidantes ejemplares

Potenciales electroquímicos estándar en disolución acuosa a 25 °C	
Media reacción catódica (reducción)	Potencial estándar E° (voltios)
$\text{Sn}^{4+}(\text{ac}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Sn}^{2+}(\text{ac})$	0,15
$\text{Cu}^{2+}(\text{ac}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu}^+(\text{ac})$	0,16
$\text{ClO}_4^-(\text{ac}) + \text{H}_2\text{O}(\text{l}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ClO}_3^-(\text{ac}) + 2\text{OH}^-(\text{ac})$	0,17
$\text{AgCl}(\text{s}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}(\text{s}) + \text{Cl}^-(\text{ac})$	0,22
$\text{Cu}^{2+}(\text{ac}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cu}(\text{s})$	0,34
$\text{ClO}_3^-(\text{ac}) + \text{H}_2\text{O}(\text{l}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ClO}_2^-(\text{ac}) + 2\text{OH}^-(\text{ac})$	0,35
$\text{IO}^-(\text{ac}) + \text{H}_2\text{O}(\text{l}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{I}^-(\text{ac}) + 2\text{OH}^-(\text{ac})$	0,49
$\text{Cu}^+(\text{ac}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Cu}(\text{s})$	0,52
$\text{I}_2(\text{s}) + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{I}^-(\text{ac})$	0,54
$\text{ClO}_2^-(\text{ac}) + \text{H}_2\text{O}(\text{l}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{ClO}^-(\text{ac}) + 2\text{OH}^-(\text{ac})$	0,59
$\text{Fe}^{3+}(\text{ac}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Fe}^{2+}(\text{ac})$	0,77
$\text{Hg}_2^{2+}(\text{ac}) + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{Hg}(\text{l})$	0,80
$\text{Ag}^+(\text{ac}) + \text{e}^- \rightarrow \text{Ag}(\text{s})$	0,80
$\text{Hg}^{2+}(\text{ac}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Hg}(\text{l})$	0,85
$\text{ClO}^-(\text{ac}) + \text{H}_2\text{O}(\text{l}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Cl}^-(\text{ac}) + 2\text{OH}^-(\text{ac})$	0,90
$2\text{Hg}^{2+}(\text{ac}) + 2\text{e}^- \rightarrow \text{Hg}_2^{2+}(\text{ac})$	0,90
$\text{NO}_3^-(\text{ac}) + 4\text{H}^+(\text{ac}) + 3\text{e}^- \rightarrow \text{NO}(\text{g}) + 2\text{H}_2\text{O}(\text{l})$	0,96
$\text{Br}_2(\text{l}) + 2\text{e}^- \rightarrow 2\text{Br}^-(\text{ac})$	1,07

Potenciales electródicos estándar en disolución acuosa a 25 °C	
Media reacción catódica (reducción)	Potencial estándar E° (voltios)
$O_2(g) + 4H^+(ac) + 4e^- \rightarrow 2H_2O(l)$	1,23
$Cr_2O_7^{2-}(ac) + 14H^+(ac) + 6e^- \rightarrow 2Cr^{3+}(ac) + 7H_2O(l)$	1,33
$Cl_2(g) + 2e^- \rightarrow 2Cl^-(ac)$	1,36
$Ce^{4+}(ac) + e^- \rightarrow Ce^{3+}(ac)$	1,44
$MnO_4^-(ac) + 8H^+(ac) + 5e^- \rightarrow Mn^{2+}(ac) + 4H_2O(l)$	1,49
$H_2O_2(ac) + 2H^+(ac) + 2e^- \rightarrow 2H_2O(l)$	1,78
$Co^{3+}(ac) + e^- \rightarrow Co^{2+}(ac)$	1,82
$S_2O_8^{2-}(ac) + 2e^- \rightarrow 2SO_4^{2-}(ac)$	2,01
$O_3(g) + 2H^+(ac) + 2e^- \rightarrow O_2(g) + H_2O(l)$	2,07
$F_2(g) + 2e^- \rightarrow 2F^-(ac)$	2,87

Para inactivar un patógeno viral utilizando peróxido de hidrógeno, se hace crecer el patógeno viral vivo hasta una densidad deseada (por ejemplo, densidad de saturación en cultivo), según cualquier procedimiento aceptable en la técnica para el crecimiento (por ejemplo, cultivar el organismo específico). Normalmente, para patógenos celulares, es deseable cultivar el patógeno hasta una fase estacionaria; como tales, los organismos son generalmente más resistentes a tensiones en un procesamiento adicional que los cultiva en la fase logarítmica. Se puede monitorizar el crecimiento en cultivo utilizando procedimientos conocidos en la técnica, tales como la medición de la densidad óptica del cultivo utilizando espectrofotometría. Cuando el patógeno es un virus, se puede monitorizar el crecimiento al titular el virus utilizando procedimientos estándar establecidos para el virus seleccionado. Por ejemplo, se pueden encontrar los procedimientos para hacer crecer virus animales, por ejemplo, en DNA Viruses: A Practical Approach, Alan J. Cann (ed.), Oxford University Press, 2000; Robinson y Cranage (eds.) Vaccine Protocols (Methods in Molecular Medicine) Humana Press, 2003, y en referencias citadas en los mismos. Los procedimientos para cultivar bacterias patógenas también son conocidos en la técnica, y pueden ser encontrados en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2ª ed., tomos 1-3, ed. Sambrook y otros, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, EE. UU., 1989. Los procedimientos para cultivar parásitos, tales como el paludismo, también son conocidos en la técnica, por ejemplo, Denise Doolan (ed.) Malaria Methods and Protocols (Methods in Molecular Medicine), Humana Press, 2002, y en referencias citadas en el mismo.

Normalmente, los organismos virales patógenos son purificados del medio en el que son crecidos o cultivados, y en el caso de patógenos que se replican dentro de una célula son purificados de los otros componentes celulares. Por ejemplo, se puede reducir la concentración relativa de los componentes no patógenos de una suspensión que incluye patógenos al menos un 50%, tal como aproximadamente un 70%, o hasta un 80%, o incluso en un 90%, 95% o más, con respecto a una preparación rudimentaria del patógeno. Los patógenos virales intracelulares pueden ser aislados o purificados de los diversos componentes de las células que infectan mediante diversos procedimientos conocidos en la técnica.

Normalmente, los virus para la producción de vacunas son crecidos bajo condiciones controladas en una línea celular certificada utilizando un medio de cultivo definido biológica y químicamente según procedimientos de cGMP. Normalmente las células son infectadas con virus con una multiplicidad apropiada de infección (MOI), y se mantiene a las células en cultivo bajo condiciones y durante un periodo de tiempo suficiente como para permitir la replicación del virus hasta una titulación elevada. Entonces, se cultivan las células mediante centrifugado (después de la liberación de la superficie de cultivo en el caso de células adherentes), y se vuelven a suspender en una disolución tamponada de forma apropiada. Para facilitar la recuperación, la disolución tamponada es normalmente hipotónica con respecto a las células, lo que provoca que las células se hinchen. Opcionalmente, se agita periódicamente la suspensión celular para garantizar una exposición más uniforme de las células a la disolución hipotónica. Entonces, se lisan las células, por ejemplo, mediante homogenización, para liberar el virus. Se centrifuga el lisado para eliminar materia particulada grande, tal como núcleos celulares, y se filtra el sobrenadante para eliminar restos celulares adicionales. Entonces, se purifica adicionalmente el virus al estratificar el sobrenadante filtrado sobre un medio adecuado de separación, tal como sacarosa. Opcionalmente, se puede procesar adicionalmente el microgránulo nuclear para aumentar la producción viral. Se vuelve a suspender el microgránulo nuclear en tampón hipotónico y se homogeniza. Se centrifuga el lisado nuclear y se filtra el sobrenadante resultante antes de que se estratifique sobre un medio de separación. Opcionalmente, se combinan las dos suspensiones virales para conseguir un gradiente de

separación volumétrica aproximadamente idéntico. Entonces, se procesa la suspensión de medio de separación/virus mediante ultracentrifugado (por ejemplo, a 55.000 × g durante 1-1,5 horas a 4 °C. Se recoge el virus en un microgránulo por medio de este procedimiento mientras que los restos celulares membranosos permanecen en la superficie de contacto. Se elimina el sobrenadante (normalmente mediante aspiración) y se vuelve a suspender el microgránulo en tampón. Entonces, se puede evaluar el virus purificado en cuanto a su recuperación y su viabilidad (por ejemplo, al determinar la concentración de proteínas y mediante ensayos de placas, respectivamente). Si se desea, se puede congelar el virus recuperado y almacenar hasta su uso.

Se conocen en la técnica procedimientos similares para purificar patógenos no virales, tales como parásitos intracelulares (por ejemplo, parásitos protozoarios, incluyendo *Plasmodium falciparum* y otras especies de *Plasmodium*, *Leishmania* (sp.), *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, y *Giardia lamblia*, al igual que especies de *Toxoplasma*, de *Eimeria*, de *Theileria*, y de *Babesia*).

Después de la purificación, se puede volver a suspender el patógeno viral en un volumen conveniente de disolución, tal como agua u otra disolución acuosa vehicular (por ejemplo, farmacéuticamente aceptable), tal como un diluto o una disolución salina fisiológica. Se añade peróxido de hidrógeno a la disolución para inactivar el patógeno. Opcionalmente, se pueden volver a suspender los patógenos directamente en una disolución de peróxido de hidrógeno. De forma alternativa, se puede añadir peróxido de hidrógeno directamente al medio de cultivo sin una purificación anterior del patógeno. Este procedimiento puede ser deseable para volver a organismos sumamente patógenos más seguros (menos infecciosos) durante el procedimiento de producción. Se puede eliminar el peróxido de hidrógeno mediante liofilización o mediante diálisis, o mediante diversos procedimientos de cromatografía como se ha descrito anteriormente. De forma similar, cuando quedan en la disolución componentes del medio u otros contaminantes no deseados en la preparación final de la vacuna, se pueden eliminar tales componentes utilizando procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, como se ha descrito anteriormente. Normalmente, las sales, los azúcares, y otros componentes tampón o del medio no son inmunogénicos, y muchos de tales componentes son coherentes con las formulaciones autorizadas por la FDA. En tales casos, no existe la necesidad de eliminar estos componentes de la preparación. En algunos casos, se pueden añadir sales o azúcares definidos (u otros estabilizadores) para estabilizar las composiciones liofilizadas. El peróxido de hidrógeno es compatible con un número de estabilizadores de vacuna (sacarosa, dextrosa, gelatina, albúmina, etc.) utilizados en la industria y reconocidos como comunes en la técnica. Una persona con un nivel normal de dominio de la técnica puede determinar empíricamente las formulaciones específicas que son óptimas para cada patógeno.

La disolución de inactivación contiene una cantidad de peróxido de hidrógeno suficiente para volver a todos los patógenos no infecciosos. Dependiendo de la densidad de los organismos en la disolución final, y del tipo de organismo, la cantidad de peróxido de hidrógeno puede variar. En general, la disolución contiene al menos aproximadamente un 0,03% de peróxido de hidrógeno. Más habitualmente, la disolución incluye al menos aproximadamente un 0,1%, tal como al menos aproximadamente un 0,5% de peróxido de hidrógeno. Normalmente, la disolución contiene al menos aproximadamente un 1% de peróxido de hidrógeno. Debido a que está fácilmente disponible comercialmente, a menudo la disolución contiene aproximadamente un 3% de peróxido de hidrógeno. No obstante, la disolución puede incluir hasta un 30% de peróxido de hidrógeno, por ejemplo, aproximadamente un 5%, o aproximadamente un 10%, o aproximadamente un 20% de peróxido de hidrógeno. El peróxido de hidrógeno de calidad de reactivo adecuado para ser utilizado en la preparación de vacunas está disponible en una disolución del 30%. Por lo tanto, aunque es posible utilizar concentraciones que superan el 30%, hay poco valor práctico, y cierto inconveniente práctico al hacerlo. Se puede conseguir la inactivación completa de la mayoría de patógenos con concentraciones entre 0,03% y 5%, así que hay poca ventaja práctica en usar una disolución que supere aproximadamente un 3% de peróxido de hidrógeno.

Se mantiene (por ejemplo, incubado) el patógeno viral en contacto con el peróxido de hidrógeno durante un periodo de tiempo suficiente como para inactivar todo el patógeno en la muestra. En general, el tiempo en la disolución de inactivación está correlacionado inversamente con la concentración de peróxido de hidrógeno en la disolución. Por ejemplo, un patógeno seleccionado puede ser inactivado en una disolución del 3% de peróxido de hidrógeno durante un periodo más breve de tiempo en comparación con el periodo requerido en una disolución del 0,03%. Se pueden determinar empíricamente el periodo de tiempo y la concentración de peróxido de hidrógeno para cualquier patógeno. Por ejemplo, llevar a cabo la inactivación en una disolución que contiene un 3% de peróxido de hidrógeno durante un periodo de aproximadamente 2 horas a temperatura ambiente garantiza una inactivación completa (100%) de una amplia gama de patógenos.

Aunque la temperatura precisa no es importante, en general es deseable mantener la disolución a una temperatura inferior a la temperatura a la que comienza la desnaturalización de los epítomos antigénicos. Por lo tanto, en general es preferente mantener la disolución a una temperatura superior a 0 °C e inferior a aproximadamente 42 °C. Más habitualmente, la inactivación se lleva a cabo a una temperatura ambiente o a aproximadamente 4 °C. Las personas con un nivel normal de dominio de la técnica apreciarán que la inactivación de patógenos utilizando peróxido de hidrógeno es eficaz en una amplia variedad de condiciones, cualquiera de las cuales proporciona una inactivación completa de un patógeno de interés. Normalmente, se seleccionan las condiciones en aras de la conveniencia de entre las condiciones que proporcionan una inactivación completa.

Aunque en general es más conveniente suspender simplemente el patógeno seleccionado en una disolución que contiene una cantidad apropiada de peróxido de hidrógeno durante un periodo suficiente como para efectuar una inactivación completa del patógeno viral, hay disponibles procedimientos alternativos para poner en contacto un patógeno viral con una disolución que contiene peróxido de hidrógeno. Estos están incluidos en los procedimientos dados a conocer. Por ejemplo, se puede producir una disolución de H_2O_2 al percolar O_2 u O_3 a través de una disolución acuosa que incluye un donador de hidrógeno.

También se pueden utilizar esterilizadores de vapor de peróxido de hidrógeno para inactivar los patógenos virales para la producción de composiciones inmunogénicas. Los esterilizadores de vapor de peróxido de hidrógeno están disponibles comercialmente. Este tipo de aparato está diseñado para la esterilización económica de superficies, por ejemplo, en el contexto de salas blancas de centros de producción, y en entornos quirúrgicos y médicos. Aunque el medio de producción del vapor varía algo entre aparatos, un esterilizador de vapor de peróxido de hidrógeno produce un vapor a partir de una disolución concentrada (por ejemplo, 30%) de peróxido de hidrógeno, y está disponible, por ejemplo, en BioQuell, Pharmaceutical Systems, Inc. (VHYPER™), y en Advanced Sterilization Products (STERRAD®). Cuando se utilizan tales dispositivos se establecen los parámetros para garantizar que la temperatura no supera aproximadamente 42 °C para evitar una desnaturalización térmica de los epítomos antigénicos predominantes durante la inactivación.

Aunque se pueden activar algunos patógenos en la fase de vapor al proyectar un aerosol que contiene el patógeno a través del peróxido de hidrógeno en fase de vapor, más habitualmente, el patógeno que va a ser inactivado se coloca sobre una superficie sólida (o se adhiere o se inmoviliza de otra manera a la misma) cuando está expuesto al vapor de peróxido de hidrógeno. Esencialmente cualquier superficie sólida es adecuada como un sustrato para la inactivación de patógenos con peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, se pueden utilizar placas o platos de cultivo tisular, incluyendo placas de microtitulación, al igual que alfileres, perlas, o membranas para proporcionar una superficie sólida sobre la que exponer un patógeno al vapor de peróxido de hidrógeno. Normalmente, la superficie sólida está seleccionada en función de la compatibilidad con las etapas de procesamiento emprendidas para recuperar el patógeno para la producción de vacunas. Por ejemplo, en los procedimientos de preparación de vacunas que suponen el filtrado o centrifugado del patógeno a través de una membrana (o filtro), la membrana puede ser retirada del dispositivo de centrifugado o de filtrado y puede ser expuesta a vapor de peróxido de hidrógeno para inactivar el patógeno recogido en la membrana. En otros casos, por ejemplo, cuando la composición de vacuna incluye el patógeno adherido a un vehículo, el patógeno está expuesto al vapor de peróxido de hidrógeno en el vehículo. Los vehículos adecuados para la formulación de vacunas incluyen microesferas biodegradables, tales como microesferas de ácido poli(láctico/glicólico) (PLGA).

Liofilización de patógenos virales inactivados

Después de la inactivación en bajas concentraciones (hasta aproximadamente un 10%, por ejemplo, entre 0,3% y aproximadamente 3%) de peróxido de hidrógeno, se puede almacenar el patógeno viral inactivado (por ejemplo, congelado en disolución) o puede ser administrado a un sujeto sin un procesamiento adicional. No obstante, para la mayoría de usos, especialmente la administración a sujetos humanos, es deseable preparar dosis unitarias en una forma conveniente para su distribución. Para hacer esto, y para eliminar el peróxido de hidrógeno de la composición de vacuna, se puede liofilizar la disolución. La liofilización en condiciones y formulaciones adecuadas tiene como resultado una composición inmunogénica (por ejemplo, una vacuna) que es estable durante periodos prolongados de tiempo entre 4 °C y la temperatura ambiente (dependiendo del patógeno), y que puede ser distribuida fácil y económicamente por todo el mundo utilizando la infraestructura existente de transporte. Los procedimientos para liofilizar las composiciones de vacuna son bien conocidos en la técnica, y son explicados con más detalle, por ejemplo, en las patentes U.S. n^{os} 3.932.943; 4.134.214; 4.710.378; 4.622.222; 6.562.350; y 6.884.422, cuyas divulgaciones están incorporadas en el presente documento por referencia.

La liofilización se lleva a cabo cuando se somete a una mezcla de disolvente/soluto a un vacío, lo que tiene como resultado la sublimación del disolvente, y deja tras de sí el o los solutos secos. Normalmente, es suficiente un vacío de al menos aproximadamente 50 Pa para promover una sublimación eficaz. Aunque se puede reducir más la presión, hacerlo tiene poco efecto sobre la tasa de secado, y bajo condiciones de presión muy reducida, se reduce la eficacia de la sublimación. Para la producción de vacunas, a menudo es conveniente liofilizar la muestra del patógeno en receptáculos adecuados para su distribución y administración (por ejemplo, en dosis unitarias o en un pequeño número de dosis múltiples). Más habitualmente, el receptáculo es un vial de vidrio, que puede estar cerrado herméticamente con un tapón de caucho. Tales viales están disponibles sin problemas en volúmenes de 2 ml, de 3 ml, de 5 ml y de 10 ml, aunque se puede utilizar cualquier volumen. También se pueden utilizar formatos alternativos de receptáculo, incluyendo por ejemplo, ampollas de vidrio y jeringas (por ejemplo, véase la patente U.S. n^o 6.605.064). Además, la composición puede ser liofilizada sin consideración especial por el receptáculo y, subsiguientemente, puede ser formulada para su administración a un sujeto, por ejemplo, en forma de polvo, de comprimido o de microgránulo. El protocolo óptimo para la liofilización puede ser determinado empíricamente para cada patógeno viral seleccionado. A continuación se proporcionan directrices generales para la liofilización de composiciones que contienen patógenos inactivados.

Aunque se puede llevar a cabo la liofilización simplemente al colocar una muestra líquida en una cámara de vacío, esto no es aconsejable en general en el contexto de la preparación de vacunas dado que puede tener como resultado una "espumación" de la muestra, lo que puede tener como resultado el daño del antígeno. Para evitar la espumación, se puede congelar una muestra de patógeno antes de la liofilización. El procedimiento y la tasa de congelación dependen de varias consideraciones. En general, se utiliza una tasa de enfriamiento relativamente lenta de entre 0,1 °C y 1,0 °C/minuto para promover el desarrollo de cristales de hielo grandes que son conducentes a la migración de vapor. Sin embargo, las tasas de enfriamiento lentos no son óptimas, generalmente, para los patógenos celulares, tales como las bacterias, los hongos y los parásitos. Bajo condiciones de enfriamiento lento, se expone al patógeno a concentraciones crecientes de solutos, incluyendo cualquier sal y componentes del medio en la muestra. Por lo tanto, las células deberían ser enfriadas más rápidamente para evitar una exposición prolongada a solutos que pueden tener un efecto adverso sobre el patógeno. Un enfriamiento a velocidades muy rápidas también es perjudicial dado que el agua intracelular es incapaz de difundirse, lo que tiene como resultado daños a las células. Aunque un enfriamiento rápido puede dar lugar a la formación de cristales de hielo pequeños desorganizados que no son óptimos para la liofilización, se puede remediar este problema al recocer térmicamente la muestra antes de la liofilización. El recocido térmico se lleva a cabo al calentar y reenfriar la muestra sin permitir que la muestra se funda. De forma alternativa, se pueden utilizar aditivos, por ejemplo, crioprotectores, para evitar el daño al patógeno durante la congelación. Los excipientes comunes farmacéuticamente aceptables que reducen el daño durante la liofilización incluyen la sacarosa y otros azúcares, aminoácidos, tales como treonina y cisteína, y tensioactivos, tales como Tween.

Como alternativa a la precongelación, se puede liofilizar la muestra de patógeno viral con un centrifugado a baja velocidad. Por ejemplo, se puede llevar a cabo una liofilización en un aparato, tal como un concentrador SPEED-VAC® (Savant), que incluye un centrifugador contenido dentro de una cámara de vacío fijado a un sistema de evacuación para eliminar el vapor del disolvente. En tal aparato, se puede llevar a cabo la liofilización a una temperatura ambiente superior a la de congelación, siempre que se mantenga la muestra durante todo el procedimiento por debajo de la temperatura a la que se produce la desnaturalización térmica de los antígenos. Por ejemplo, como se expone en los Ejemplos, se puede llevar a cabo la liofilización de forma conveniente a temperatura ambiente (o a 4 °C) en un concentrador SPEED-VAC®.

Después de la sublimación del disolvente se puede sellar el receptáculo que contiene el patógeno viral inactivado para mantener la esterilidad después de la retirada del aparato de liofilización. Más habitualmente, se sellan los viales de vidrio con tapones de caucho, que pueden ser penetrados por medio de una aguja de inyección para la retirada de la composición de vacuna después de la reconstitución. Una ventaja de este sistema es que los viales pueden ser cerrados herméticamente sin liberar el vacío, lo que garantiza la integridad de la muestra. Normalmente, las ampollas de vidrio están cerradas herméticamente después de la liberación del vacío. Para preservar la integridad del cierre hermético, y evitar la introducción de aire ambiente, se puede llenar el vial con un gas estéril, tal como argón o nitrógeno antes de cerrar herméticamente. Los gases inertes, tales como argón pueden proporcionar una mayor estabilidad en comparación con nitrógeno, si se espera que la composición de vacuna vaya a ser almacenada durante periodos prolongados de tiempo.

La liofilización proporciona un medio conveniente adaptable para producir una composición estéril estable en el contexto de la fabricación comercial. No obstante, para ciertas aplicaciones, están justificados procedimientos alternativos. Tales procedimientos también son adecuados para procesar patógenos inactivados utilizando una disolución que contiene peróxido de hidrógeno. Por ejemplo, en aplicaciones en las que se va a administrar un antígeno en combinación con un adyuvante de alumbre-hidrogel, la liofilización no es apropiada dado que se altera la estructura responsable de una mayor inmunogenicidad mediante la liofilización. En tales casos, pueden ser preferentes procedimientos alternativos, tales como la liofilización por aspersión. La liofilización por aspersión puede llevarse a cabo al pulverizar el alumbre-gel conjugado con el patógeno en nitrógeno líquido.

Reconstitución y administración

Las composiciones inmunogénicas, tales como las vacunas, que son producidas como polvos liofilizados se mezclan normalmente con un líquido para ser administradas. Este procedimiento es conocido como "reconstitución", y el líquido utilizado es denominado habitualmente "diluyente". Para fines de administración, especialmente a sujetos humanos, es importante que el diluyente sea una formulación farmacéuticamente aceptable. Normalmente, la reconstitución de la composición liofilizada se lleva a cabo utilizando una jeringa y aguja estériles para cada vial de diluyente. Se utiliza el diluyente correcto para cada tipo y lote para garantizar una actividad, una seguridad y una esterilidad adecuadas de la mezcla resultante. Los diluyentes están diseñados específicamente para optimizar la administración y la eficacia de la composición seleccionada. Los diluyentes comunes incluyen tales aditivos como: estabilizadores para mejorar la estabilidad térmica de la vacuna; agentes, tales como tensioactivos, para ayudar a disolver el polvo en un líquido; y tampones para garantizar el equilibrio ácido correcto de la composición reconstituida. Opcionalmente, el diluyente puede contener un conservante (por ejemplo, un bactericida y/o un fungicida) para mantener la esterilidad después de la reconstitución. Normalmente, se requieren conservantes (por ejemplo, la FDA) cuando se reconstituye la composición en una formulación de múltiples dosis.

Administración de composiciones inmunogénicas tales como vacunas (procedimientos terapéuticos)

Las composiciones inmunogénicas (tales como vacunas u otros medicamentos) dadas a conocer en el presente documento pueden ser administradas a un sujeto para suscitar una respuesta inmunitaria contra un patógeno. Más habitualmente, las composiciones son administradas para suscitar una respuesta inmunitaria profiláctica contra un organismo patógeno al que el sujeto aún no ha sido expuesto. Por ejemplo, las composiciones de vacuna que incluyen patógenos virales inactivados con peróxido de hidrógeno pueden ser administradas como parte de un esfuerzo localizado o generalizado de vacunación. Una respuesta inmunitaria suscitada por la administración de tales composiciones de vacuna normalmente incluye una respuesta anticuerpo neutralizante, y puede incluir, además, una respuesta de las células T, por ejemplo, una respuesta citotóxica de las células T que selecciona patógenos celulares. En consecuencia, se incluyen en el presente documento procedimientos para fabricar un medicamento o una composición farmacéutica que contiene patógenos virales inactivados con peróxido de hidrógeno. Las composiciones farmacéuticas (medicamentos) incluyen al menos un patógeno viral inactivado mediante contacto con una disolución que contiene peróxido de hidrógeno, en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

En algunos casos, la composición inmunogénica puede incluir una combinación de patógenos, tal como una combinación de virus (por ejemplo, virus de la parotiditis, virus del sarampión, virus de la rubéola), o una combinación de patógenos seleccionados de distintas clases de organismos, por ejemplo, uno o más virus y una o más bacterias, y similares.

La cantidad de patógeno incluida en la composición es suficiente para suscitar una respuesta inmunitaria cuando es administrada a un sujeto. Por ejemplo, cuando es administrada a un sujeto en una o más dosis, una composición de vacuna que contiene un patógeno viral inactivado suscita favorablemente una respuesta inmunitaria protectora contra el patógeno. Una dosis de la composición de vacuna puede incluir al menos aproximadamente un 0,1% p/p de patógeno inactivado hasta un 99% p/p de patógeno viral inactivado, con el resto de la composición de la vacuna compuesto de constituyentes farmacéuticamente aceptables, tales como un vehículo farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable. Se pueden encontrar directrices con respecto a la formulación de vacunas, por ejemplo, en las patentes U.S. n^{os} 6.890.542 y 6.651.655. En un ejemplo específico no limitante la composición de vacuna (medicamento) incluye al menos aproximadamente un 1%, tal como aproximadamente un 5%, aproximadamente un 10%, aproximadamente un 20%, aproximadamente un 30% o aproximadamente un 50% p/p de patógeno viral inactivado. Como será evidente para una persona con un nivel normal de dominio de la técnica, la cantidad de patógeno presente en la formulación de vacuna depende de si la composición es un líquido o un sólido. La cantidad de patógeno viral inactivado en una composición sólida puede superar la tolerable en una composición líquida. De forma alternativa, la cantidad de patógeno viral inactivado puede ser calculada con respecto a la cantidad comparable de un patógeno vivo o inactivado requerida para proporcionar una respuesta inmunitaria. Por ejemplo, se puede incluir un equivalente de dosificación en partículas virales desde aproximadamente 10^6 hasta aproximadamente 10^{12} unidades de formación de placas (UFP) de virus vivo o atenuado en una dosis de la composición de vacuna. De forma similar, una composición de vacuna puede incluir una cantidad de bacterias, hongos o parásitos inactivados desde aproximadamente 10^3 hasta aproximadamente 10^{10} organismos vivos. De forma alternativa, se puede proporcionar la dosis en términos de contenido o concentración de proteínas. Por ejemplo, una dosis puede incluir desde aproximadamente 0,1 μg , tal como al menos aproximadamente 0,5 μg de proteína. Por ejemplo, una dosis puede incluir aproximadamente 0,1 μg de un virus aislado o purificado u otro patógeno hasta aproximadamente 100 μg , o más de un patógeno seleccionado. Aunque las dosis equivalentes en unidades infecciosas (por ejemplo, UFP) pueden variar entre patógenos, se puede extrapolar (por ejemplo, de las UFP) la dosis apropiada de proteínas o pueden ser determinadas empíricamente. Por ejemplo, en una preparación típica, 1 μg de virus vaccinia purificado es equivalente a aproximadamente 2×10^6 UFP. Se pueden determinar conversiones similares para cualquier patógeno de interés.

Normalmente, la preparación de una composición de vacuna (medicamento) conlleva preparar una composición farmacéutica que está esencialmente libre de pirógenos, al igual que cualquier otra impureza que pudiera ser nociva para seres humanos o animales. Normalmente, la composición farmacéutica contiene sales y tampones apropiados para hacer estables a los componentes de la composición y permitir la presentación de los péptidos por las células que presentan antígeno. Tales componentes pueden ser suministrados en forma liofilizada, o pueden ser incluidos en un diluyente utilizado para la reconstitución de una forma liofilizada en una forma líquida adecuada para ser administrada. De forma alternativa, cuando se prepara el patógeno viral inactivado para ser administrado en un estado sólido (por ejemplo, como un polvo o microgránulo), se incluye un vehículo sólido adecuado en la formulación.

Normalmente, las composiciones acuosas incluyen una cantidad eficaz del patógeno viral inactivado dispersa (por ejemplo, disuelto o suspendido) en un diluyente o medio acuoso farmacéuticamente aceptable. La frase "farmacéuticamente aceptable" hace referencia a entidades y composiciones moleculares que no producen una reacción adversa, alérgica u otra reacción no deseable cuando son administradas a un sujeto humano o animal. Según se utiliza en el presente documento, "vehículo farmacéuticamente aceptable" incluye cualquier disolvente, medio de dispersión, revestimiento, agente isotónico y de retardo de la absorción y similares, y todos ellos. Opcionalmente, un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable puede incluir un antibacteriano, fungicida u otro conservante. El uso de tales medios y agentes para las sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Salvo en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con la producción

de una respuesta inmunitaria por un patógeno viral inactivado, se contempla su uso en las composiciones inmunogénicas. También se pueden incorporar ingredientes activos adicionales en las composiciones. Por ejemplo, ciertas composiciones farmacéuticas pueden incluir el patógeno inactivado en un diluyente acuoso, mezclado con un tensioactivo adecuado, tal como hidroxipropilcelulosa. También se pueden preparar dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos, y mezclas de los mismos y en aceites. En algunos casos (por ejemplo, cuando se consideran deseables las formulaciones líquidas, o cuando se reconstituye la composición de vacuna liofilizada para múltiples dosis en un único receptáculo), estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

Las personas con un nivel normal de dominio de la técnica conocen vehículos, excipientes y diluyentes farmacéuticamente aceptables en lo descrito. Por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, de E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, Pensilvania, EE. UU., 15ª edición (1975), describe composiciones y formulaciones adecuadas para la administración farmacéutica de patógenos inactivados.

En general, la naturaleza del vehículo dependerá del modo particular de administración que esté siendo empleado. Por ejemplo, las formulaciones parenterales normalmente comprenden fluidos inyectables que incluyen fluidos farmacéutica y fisiológicamente aceptables tales como agua, suero fisiológico, disoluciones salinas equilibradas, dextrosa acuosa, glicerol o similares como vehículo. Para composiciones sólidas (por ejemplo, formas de polvo, de píldora, de comprimido, o de cápsula), vehículos sólidos no tóxicos convencionales pueden incluir, por ejemplo, calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón o estearato de magnesio. Además de vehículos biológicamente neutros, las composiciones farmacéuticas que van a ser administradas pueden contener cantidades reducidas de sustancias auxiliares no tóxicas, tales como agentes humectantes o emulsionantes, conservantes, y agentes tampón del pH y similares, por ejemplo, acetato de sodio o monolaureato de sorbitano.

Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas (medicamentos) pueden incluir uno o más de un detergente estabilizador, un agente de formación de micelas, y un aceite. Los detergentes estabilizadores, los agentes de formación de micelas, y los aceites adecuados están detallados en la patente U.S. nº 5.585.103; en la patente U.S. nº 5.709.860; en la patente U.S. nº 5.270.202; y en la patente U.S. nº 5.695.770. Un detergente estabilizador es cualquier detergente que permite que los componentes de la emulsión permanezcan en una emulsión estable. Tales detergentes incluyen polisorbato, 80 (TWEEN) (Sorbitan-mono-9-octadecenoate-poly(oxy-1,2-ethanediyl); fabricado por ICI Americas, Wilmington, Delaware, EE. UU.), TWEEN 40™, TWEEN 20™, TWEEN 60™, Zwittergent™ 3-12, TEEPOL HB7™, y SPAN 85™. Normalmente, se proporciona a estos detergentes en una cantidad de aproximadamente 0,05 hasta 0,5%, tal como aproximadamente 0,2%. Un agente de formación de micelas es un agente que es capaz de estabilizar la emulsión formada con los otros componentes, de manera que se forme una estructura similar a una micela. Tales agentes causan, en general, algo de irritación en el sitio de la inyección para reclutar macrófagos para aumentar la respuesta celular. Ejemplos de tales agentes incluyen tensioactivos poliméricos descritos, por ejemplo, por Schmolka, J. Am. Oil. Chem. Soc. 54: 110, 1977, y por Hunter y otros, J. Immunol. 129: 1244, 1981, y tales agentes como PLURONIC™ L62LF, L101, y L64, PEG1000, y TETRONIC™ 1501, 150R1, 701, 901, 1301, y 130R1. Las estructuras químicas de tales agentes son bien conocidas en la técnica. En una realización, se escoge el agente para que tenga un equilibrio hidrófilo-lipófilo (HLB) entre 0 y 2, como se define en Hunter y Bennett, J. Immun. 133: 3167, 1984. Se puede proporcionar el agente en una cantidad eficaz, por ejemplo entre 0,5 y 10%, o en una cantidad entre 1,25 y 5%.

Se escoge el aceite incluido en la composición para promover la retención del patógeno en una emulsión de aceite-agua y, preferentemente, tiene una temperatura de fusión inferior a 65 °C, de manera que se forma la emulsión bien a temperatura ambiente, o bien una vez que se ajusta la temperatura de la emulsión hasta la temperatura ambiente. Ejemplos de tales aceites incluyen escualeno, escualano, EICOSANE™, tetratetracontano, glicerol, y aceite de cacahuete u otros aceites vegetales. En un ejemplo no limitante específico, se proporciona el aceite en una cantidad entre 1 y 10%, o entre 2,5 y 5%. El aceite debería ser tanto biodegradable como biocompatible, de forma que el cuerpo pueda descomponer el aceite con el paso del tiempo, y de forma que no sean evidentes efectos adversos, tales como granulomas, tras el uso del aceite.

Opcionalmente, los medicamentos o composiciones farmacéuticas pueden incluir un adyuvante adecuado para aumentar la respuesta inmunitaria contra el patógeno. Según se utiliza en el presente documento, un "adyuvante" es cualquier potenciador o mejorador de una respuesta inmunitaria. Se pretende que el término "adecuado" incluya cualquier sustancia que pueda ser utilizada en combinación con el patógeno seleccionado para aumentar la respuesta inmunitaria, sin producir reacciones adversas en el sujeto vacunado. Se pueden determinar fácilmente las cantidades eficaces de un adyuvante específico de forma que se optimice el efecto de potenciación del adyuvante sobre la respuesta inmunitaria de un sujeto vacunado. Por ejemplo, los adyuvantes adecuados en el contexto de las formulaciones de vacuna incluyen entre 0,5% - 5% (por ejemplo, 2%) de hidróxido de aluminio (o fosfato de aluminio) y emulsión oleosa MF-59 (0,5% de polisorbato 80 y 0,5% de trioleato de sorbitano). El escualeno (emulsión acuosa al 5,0%) es otro adyuvante que ha sido utilizado favorablemente en el contexto de las vacunas. Por ejemplo, el adyuvante puede ser una mezcla de detergentes estabilizadores, agente de formación de micelas, y aceite disponible con el nombre de Provax® (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, California, EE. UU.). Un adyuvante también puede ser un ácido nucleico inmunoestimulador, tal como un ácido nucleico que incluye un motivo CpG. Otros adyuvantes incluyen emulsiones de aceite mineral, vegetal o de pescado con agua, adyuvante incompleto de

- 5 Freund, E. Coli J5, sulfato de dextrano, sulfato de hierro, óxido de hierro, alginato de sodio, bacto-adyuvante, ciertos polímeros sintéticos tales como Carbopol (BF Goodrich Company, Cleveland, Ohio, EE. UU.), poliaminoácidos y copolímeros de aminoácidos, saponina, carragenano, REGRESSIN (Vetrepharm, Athens, Georgia, EE. UU.), AVRIDINE (N, N-dioctadecil-N',N'-bis(2-hidroxiethyl)-propanodiamina), polímeros polidispersos de manano de cadena larga con enlace beta (1,4) intercalados con grupos O-acetilados (por ejemplo, ACEMANNAN), extractos desproteinizados de pared celular sumamente purificados derivados de una cepa no patógena de especies de *Mycobacterium* (por ejemplo, EQUIMUNE, Vetrepharm Research Inc., Athens, Georgia, EE. UU.), monooleato de manita, aceite de parafina y dipéptido de muramilo. Una persona con un nivel normal de dominio de la técnica puede seleccionar un adyuvante adecuado.
- 10 Las composiciones farmacéuticas (medicamentos) pueden estar preparadas para ser utilizadas en regímenes terapéuticos o profilácticos (por ejemplo, vacunas) y pueden ser administradas a sujetos humanos o no humanos para suscitar una respuesta inmunitaria contra uno o más patógenos. Por ejemplo, las composiciones descritas en el presente documento pueden ser administradas a un sujeto humano (o no humano) para suscitar una respuesta inmunitaria protectora contra uno o más patógenos. Para suscitar una respuesta inmunitaria, se administra a un
- 15 sujeto, tal como un sujeto humano (o no humano) una cantidad terapéuticamente eficaz (por ejemplo, inmunológicamente eficaz) del patógeno inactivado.
- Una "cantidad terapéuticamente eficaz" es una cantidad de una composición utilizada para conseguir un efecto deseado en un sujeto que está siendo tratado. Por ejemplo, esta puede ser la cantidad necesaria para estimular una respuesta inmunitaria, para evitar una infección, para reducir síntomas, o inhibir la transmisión de un patógeno.
- 20 Cuando se administra a un sujeto, se utilizará generalmente una dosis que conseguirá las concentraciones tisulares diana (por ejemplo, en células que presentan antígeno) que está determinada empíricamente para conseguir un efecto *in vitro*. Las personas con un nivel normal de dominio de la técnica pueden determinar tales dosis sin una experimentación indebida.
- Una composición inmunogénica, tal como una composición de vacuna que contiene un patógeno inactivado, puede ser administrada mediante cualquier medio conocido por un experto en la técnica, tal como mediante inyección intramuscular, subcutánea, o intravenosa, pero se contemplan incluso las vías oral, nasal, y transdérmica. En una realización, la administración es mediante inyección subcutánea o intramuscular. Para prolongar el tiempo durante el que el patógeno inactivado está disponible para estimular una respuesta, se puede proporcionar el péptido como una inyección oleosa, como un sistema particulado, o como un implante. El sistema particulado puede ser una
- 25 micropartícula, una microcápsula, una microesfera, una nanocápsula, o una partícula similar. Se ha demostrado que un vehículo de particulado basado en un polímero sintético actúa como un adyuvante para mejorar la respuesta inmunitaria, además de proporcionar una liberación controlada.
- Como alternativa a las formulaciones líquidas, la composición puede ser administrada en forma sólida, por ejemplo, como un polvo, microgránulo o comprimido. Por ejemplo, la composición de vacuna puede ser administrada como un polvo utilizando un dispositivo de inyección transdérmica sin aguja, tal como el dispositivo de inyección POWDERJECT® impulsado por helio. Este aparato utiliza gas helio presurizado para propulsar una formulación de polvo de una composición de vacuna, por ejemplo, que contiene un patógeno inactivado, a una velocidad elevada, de forma que las partículas de vacuna perforan el estrato córneo y se posan en la epidermis.
- 35 También se pueden utilizar polímeros para una liberación controlada. Se conocen en la técnica diversas matrices poliméricas degradables y no degradables para ser utilizadas en una liberación controlada de fármacos (Langer, Accounts Chem. Res. 26: 537, 1993). Por ejemplo, el copolímero de bloque, Poloxamer 407 existe como un líquido viscoso, aunque es móvil a bajas temperaturas, pero forma un gel semisólido a la temperatura corporal. Se ha demostrado que es un vehículo eficaz para la formulación y la administración sostenida de interleucina-2 recombinante y de ureasa (Johnston y otros, Pharm. Res. 9: 425; 1992; y Pec, J. Parent. Sci. Tech. 44(2): 58, 1990).
- 40 De forma alternativa, se ha utilizado hidroxapatita como un microvehículo para una liberación controlada de proteínas (Ijntema y otros, Int. J. Pharm. 112: 215, 1994). En otro aspecto más, se utilizan liposomas para una liberación controlada al igual que para una selección de diana por parte del fármaco encapsulado en lípidos (Betageri y otros, Liposome Drug Delivery Systems, Technomic Publishing Co., Inc., Lancaster, Pensilvania, EE. UU., 1993). Se conocen numerosos sistemas adicionales para la administración controlada de proteínas terapéuticas (por ejemplo, patente U.S. nº 5.055.303; patente U.S. nº 5.188.837; patente U.S. nº 4.235.871; patente U.S. nº 4.501.728; patente U.S. nº 4.837.028; patente U.S. nº 4.957.735; y patente U.S. nº 5.019.369; patente U.S. nº 5.055.303; patente U.S. nº 5.514.670; patente U.S. nº 5.413.797; patente U.S. nº 5.268.164; patente U.S. nº 5.004.697; patente U.S. nº 4.902.505; patente U.S. nº 5.506.206; patente U.S. nº 5.271.961; patente U.S. nº 5.254.342; y patente U.S. nº 5.534.496).
- 45 En un ejemplo no limitante específico, se administra el patógeno viral inactivado para suscitar una respuesta inmunitaria celular (por ejemplo, una respuesta del linfocito T citotóxico (CTL)). Se conocen varios medios para inducir respuestas celulares, tanto *in vitro* como *in vivo*. Se han identificado lípidos como agentes capaces de ayudar a cebar CTL *in vivo* contra diversos antígenos. Por ejemplo, como se describe en la patente U.S. nº 5.662.907, se pueden unir residuos de ácido palmítico a los grupos amino alfa y épsilon de un residuo de lisina y luego pueden ser enlazados (por ejemplo, mediante uno o más residuos de enlace, tales como glicina, glicina-glicina, serina, serina-
- 50
- 60

serina, o similares) a un péptido o una proteína inmunogénicos. Entonces, el péptido lipidado puede ser inyectado directamente en forma micelas, incorporado en un liposoma, o emulsionado en un adyuvante. Como otro ejemplo, se pueden utilizar lipoproteínas de *E. Coli*, tales como astripalmitoil-S-glicerilcisteinilseril-serina para cebar CTL tumorales específicos cuando están unidos covalentemente a un péptido apropiado (véase, Deres y otros, Nature 342: 561, 1989). Además, dado que la inducción de anticuerpos neutralizantes también puede ser cebada con la misma molécula conjugada con un péptido que presente un epitopo apropiado, se pueden combinar dos composiciones para suscitar respuestas tanto humorales como mediadas por células cuando se considere que es deseable.

Se administran dosificaciones de patógeno viral inactivado que son suficientes para suscitar una respuesta inmunitaria, por ejemplo, una respuesta inmunitaria protectora, en un sujeto. Con respecto a los patógenos virales, la dosificación se calcula normalmente en función de la cantidad de materia biológica equivalente a una titulación especificada de virus infeccioso (por ejemplo, virulento o atenuado). Por ejemplo, se puede administrar una dosis equivalente a aproximadamente 10^6 , o aproximadamente 10^7 , o aproximadamente 10^8 , o aproximadamente 10^9 , o aproximadamente 10^{10} , o aproximadamente 10^{11} o aproximadamente 10^{12} , o aún más de virus vivo por dosis para suscitar una respuesta inmunitaria en un sujeto. En algunos casos, la dosis incluye una cantidad en exceso de la cantidad de un virus vivo utilizado para suscitar una respuesta inmunitaria, dado que la vacuna inactivada es incapaz de aumentar en número después de ser administrada en el sujeto. Cuando se calcula la cantidad de un patógeno celular, por ejemplo, una bacteria, un hongo o un parásito, se puede calcular la cantidad mediante comparación con una dosis de bacterias vivas, por ejemplo, desde aproximadamente 10^3 células u organismos hasta aproximadamente 10^{10} organismos vivos, dependiendo de la formulación. Por ejemplo, la dosis puede incluir al menos aproximadamente 100 nanogramos (o 200 nanogramos, o 500 nanogramos, o 1 microgramo) de antígeno proteico por dosis hasta aproximadamente 25 mg (por ejemplo, aproximadamente 10 mg, o aproximadamente 15 mg, o aproximadamente 20 mg), o aún más de un patógeno viral inactivado. Normalmente, la composición de vacuna incluye constituyentes o componentes farmacéuticamente aceptables adicionales. En consecuencia, la composición de vacuna puede incluir al menos aproximadamente un 0,1% p/p de patógeno inactivado hasta aproximadamente un 99% p/p de patógeno inactivado, con el resto de la composición de vacuna compuesto de constituyentes farmacéuticamente aceptables, tales como uno o más de un vehículo farmacéuticamente aceptable, un estabilizador farmacéuticamente aceptable y/o un diluyente farmacéuticamente aceptable. Se pueden encontrar directrices con respecto a la formulación de vacunas, por ejemplo, en las patentes U.S. n^{os} 6.890.542, y 6.651.655. Las dosis pueden ser calculadas en función de la concentración de proteínas (o unidades infecciosas, tales como UFP, de equivalentes de unidades infecciosas). Se puede determinar empíricamente la dosificación óptima, por ejemplo, en estudios preclínicos en ratones y primates no humanos, seguido de ensayo en seres humanos en un ensayo clínico de fase I. Los procedimientos en sí para preparar composiciones administrables serán conocidos o evidentes para los expertos en la técnica y están descritos con más detalle en tales publicaciones como Remington's Pharmaceutical Sciences, 19^a ed., Mack Publishing Company, Easton, Pensilvania, EE. UU., 1995.

Normalmente, pero no siempre, se administran las composiciones de vacuna antes de la exposición de un sujeto a un patógeno, por ejemplo, como una vacuna. Las composiciones de vacuna pueden ser preparadas al inactivar una amplia gama de patógenos virales utilizando peróxido de hidrógeno según los procedimientos descritos en el presente documento. Por ejemplo, se pueden preparar composiciones de vacuna al inactivar un virus patógeno con una disolución que contiene peróxido de hidrógeno. Ejemplos no limitantes de virus que pueden ser inactivados utilizando peróxido de hidrógeno incluyen: picomavirus (incluyendo enterovirus), paramixovirus, bunyavirus, coronavirus, adenovirus, parvovirus, retrovirus, togavirus, arenavirus, flavivirus, herpesvirus, picomavirus, hepadnavirus, ortomixovirus, rabdovirus, y ortopoxvirus (por ejemplo, poxvirus), tales como virus de la polio, virus del sarampión, virus de la parotiditis, virus de la parainfluenza, virus de la enfermedad de Newcastle, virus de la rubéola, virus de la encefalitis equina del este y del oeste, virus de Lassa, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus del Nilo occidental, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis por garrapatas, virus de la encefalitis de St. Louis, virus de la encefalitis japonesa, virus de la varicela zóster (VZV), citomegalovirus, virus del herpes simple, retrovirus incluyendo el VIH (virus de la inmunodeficiencia humana), virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de la influenza, virus de la rabia, molusco contagioso (un molluscipoxvirus) y virus de la viruela (normalmente, virus vaccinia).

También se pueden inactivar patógenos bacterianos utilizando peróxido de hidrógeno para ser utilizados en composiciones de vacuna. Ejemplos no limitantes de bacterias que pueden ser inactivadas con peróxido de hidrógeno según los procedimientos descritos en el presente documento incluyen: *Corynebacterium diptheriae*, *Bordatella pertussis*, *Clostridium tetani*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, y *Bacillus anthracis*.

También se pueden producir composiciones de vacuna a partir de patógenos fúngicos inactivados utilizando peróxido de hidrógeno. Los patógenos fúngicos ejemplares incluyen: *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus*, y *Cryptococcus neoformans*. Los procedimientos dados a conocer en el presente documento también pueden ser utilizados para inactivar parásitos, especialmente parásitos protozoarios, tales como *Plasmodium falciparum* y otras especies de *Plasmodium*, *Leishmania* (sp.), *Cryptosporidium parvum*, *Entamoeba histolytica*, y *Giardia lamblia*, al igual que especies de *Toxoplasma*, *Eimeria*, *Theileria*, y *Babesia*.

Se proporcionan los siguientes ejemplos para ilustrar ciertas características y/o realizaciones particulares.

Ejemplos

Ejemplo 1: se retienen epítomos antigénicos predominantes tras la inactivación con peróxido de hidrógeno.

5 Para demostrar que se conservaban epítomos antigénicos predominantes después de la inactivación con peróxido de hidrógeno, se llevó a cabo un ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) para evaluar si se podían enlazar al patógeno inactivado con peróxido de hidrógeno anticuerpos específicos al patógeno. Se llevaron a cabo ensayos ELISA específicos para el virus vaccinia como se describe por Hammarlund y otros, (Nature Medicine 9: 1131-1137, 2003), utilizando lisado de virus vaccinia completo (cepa: WR) o lisado de virus vaccinia completo inactivado utilizando uno de varios procedimientos distintos: 1) inactivación con calor a 56 °C durante 2 horas; 2) 10 inactivación con calor a 100 °C durante 10 minutos; 3) luz UV 5 julios; 4) luz UV 10 julios; 5) 1% de formaldehído durante 2 horas; o 6) 3% de peróxido de hidrógeno durante 2 horas. Se utilizaron lisados de virus con una dilución de 1:800 en disolución salina tamponada con fosfato (PBS). Se incluyó un control positivo interno en cada placa para normalizar valores ELISA entre placas y entre ensayos llevados a cabo en distintos días. Se utilizó plasma humano 1 año después de una vacunación contra la viruela como una muestra de control positivo (~normalizado a 10.000 EU). 15 Se utilizó plasma humano previo a la vacunación, de un sujeto no vacunado como control negativo. Se añadieron diluciones triples (comenzando con una dilución de 1:30) de plasma o suero a placas prebloqueadas y fueron incubadas durante 1 hora. Después de lavar, se incubaron las placas durante 1 hora con anticuerpo monoclonal de ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante a la IgG (γ) humana (PharMingen). Después de una etapa adicional de lavado, se añadieron reactivos de detección, seguido de 1M de HCl, y se leyeron las placas en un lector de placas ELISA. Se determinaron titulaciones de anticuerpos mediante transformación logarítmica de la porción lineal de la curva, con 0,1 de unidades ópticas de densidad (O.D.) utilizadas como el punto final y se llevó a cabo la conversión con los valores finales.

25 Se muestran los resultados de un ELISA ejemplar en la FIG. 1. Una inactivación con calor o una inactivación con luz UV tuvo como resultado una pérdida de anticuerpos específicos al virus unidos al antígeno viral en la placa ELISA (es decir, una pérdida de titulación de ELISA), supuestamente debida a la destrucción de epítomos de unión a anticuerpos. En cambio, los antígenos virales que fueron inactivados con peróxido de hidrógeno o formaldehído retuvieron su composición antigénica casi igual de bien que el virus vivo que no fue modificado por ningún tratamiento de inactivación.

Ejemplo 2: inmunogenicidad de virus vaccinia inactivado con peróxido de hidrógeno.

30 Para demostrar que se conservaba la inmunogenicidad de virus vaccinia inactivado con peróxido de hidrógeno, se vacunaron ratones con virus vaccinia vivo (1×10^7 ufp) o dos concentraciones distintas de virus vaccinia inactivados con 3% de peróxido de hidrógeno. Se añadió un volumen de 1:10 de 30% de peróxido de hidrógeno a una suspensión de virus, teniendo como resultado una concentración final de 3% de peróxido de hidrógeno durante el procedimiento de inactivación. Los ratones sujeto fueron inyectados con 1 μ g ($\sim 10^7$ equivalentes ufp de virus vivo) o 35 0,1 μ g ($\sim 10^6$ equivalentes ufp de virus vivo) en la disolución de inactivación con peróxido de hidrógeno, o después de la diálisis con PBS estéril, o liofilización y reconstitución en agua estéril. La liofilización fue llevada a cabo a temperatura ambiente en un concentrador SPEED-VAC® (Savant). Se inyectó virus vivo intraperitonealmente en un volumen de 500 μ L de medio de cultivo tisular. Se mezclaron las preparaciones inactivadas de vacuna con un adyuvante humano autorizado por la FDA, MPL (lípidos A de monofosforilo, comercializado por Conixa) 40 inmediatamente antes de la inyección intraperitoneal. Después de la vacunación de recuerdo (utilizando la misma preparación de vacuna y la misma dosis de antígeno viral) el día 21 después de la vacunación primaria, se consiguió un aumento adicional en titulaciones de anticuerpos. Los ratones que recibieron una infección de virus vaccinia vivo no fueron sometidos a una inyección de recuerdo porque, en este caso, el virus es un antígeno replicativo producido internamente durante varios días que actúa como un "recuerdo" después de la inyección primaria. Se descubrió que 45 la vacuna de virus inactivado con peróxido de hidrógeno proporciona una vacunación eficaz con independencia de si se conservaba peróxido de hidrógeno residual en la preparación de vacuna durante la inyección (muestras de H₂O₂) o si fue eliminado mediante liofilización y reconstitución (liof.) o mediante diálisis (diál.). Como se muestra en la FIG. 2, el virus inactivado con peróxido de hidrógeno conservó su inmunogenicidad, y suscitó una respuesta inmunitaria equivalente en titulación al virus vaccinia vivo, con independencia del tratamiento posterior a la inactivación.

50 Ejemplo 3: inactivación de patógenos con concentraciones muy bajas de H₂O₂

Para demostrar que el peróxido de hidrógeno inactiva de forma eficaz los patógenos en un amplio intervalo de concentraciones, se incubó virus vaccinia con diversas concentraciones de peróxido de hidrógeno y fue evaluada su infectividad.

55 Se recuperó virus después de la infección de las células BSC-40 con una MOI de 0,1 durante 48 horas. Se cosechó el virus después de que las células mostraran un 100% de CPE (efecto citopático, normalmente 48 h posterior a la infección) al raspar las células de la superficie del frasco de cultivo. Las células y el medio de cultivo acompañante fueron centrifugados a 2000 rpm durante 10 minutos a 4 °C (en un tubo cónico de 50 ml). Las células fueron

suspendidas de nuevo en 4 ml de 10 mM de Tris-Cl ph 8, y se colocó la suspensión celular sobre hielo durante 15 minutos para hacer que se hinchen las células. Se mezcló la suspensión mediante centrifugación vorticial cada 3 minutos. Se lisó la suspensión utilizando un homogenizador Dounce con un martinete "ajustado" durante 50 carreras. Se centrifugó el homogenado a 2000 rpm durante 10 minutos a 4 °C para sacar los núcleos por fuerza centrífuga. Se retiró el sobrenadante utilizando una pipeta, y fue filtrado utilizando un filtro de 0,8 µm. Se estratifica el sobrenadante filtrado sobre un amortiguador de 6 ml de 36% de sacarosa y fue colocado sobre hielo, mientras que se volvió a suspender el microgranulado en 2 ml de 10 mM de Tris-Cl ph 8 y fue homogeneizado de nuevo como se ha indicado anteriormente. Este segundo homogenado también fue centrifugado a 2000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se retiró el sobrenadante y fue filtrado con un filtro de 0,8 µm. Entonces, el sobrenadante se estratificó sobre el amortiguador de 36% de sacarosa, de forma que un total de (aproximadamente) 6 ml de virus rudimentario de reserva se estratificó sobre un amortiguador de 6 ml de sacarosa. Se separó el sobrenadante filtrado mediante ultracentrifugado a 18000 rpm (55000 g) durante 8 minutos a 4 °C. Se conservaban restos membranosos en la superficie de contacto de la sacarosa. El virus fue granulado. Se aspiró el sobrenadante, y se volvió a suspender el microgranulado de virus en 500 µl de 10 mM de Tris-Cl ph 8. Se evaluó el virus purificado mediante cuantificación proteínica y un ensayo de placa para determinar la producción y la viabilidad. La reserva fue almacenada a -80 °C hasta su uso.

Se expuso al virus vaccinia vivo a distintas concentraciones de H₂O₂ durante 2 horas y luego fue diluido inmediatamente y sometido a ensayo en busca de virus infeccioso mediante ensayo de placa. La FIG. 3 ilustra de forma gráfica los resultados de un ensayo ejemplar de placa.

Cada placa representa una unidad infecciosa de virus y después del tratamiento con H₂O₂ a concentraciones de solo 0,03%, no se pudo detectar virus infeccioso. Estos resultados demostraron que el H₂O₂ inactiva de forma eficaz los patógenos, tales como virus, a concentraciones de solo 0,03%.

Ejemplo 4: vacunas inactivadas con H₂O₂ generan respuestas inmunitarias deseadas

La capacidad de los patógenos inactivados con H₂O₂ para suscitar una respuesta inmunitaria deseada (por ejemplo, inmunológicamente relevante) fue confirmada al vacunar ratones con virus vaccinia inactivado y al medir las respuestas de las células T CD4+ y CD8+, y mediante ensayo de neutralización de placas.

Se vacunaron ratones BALB/c intraperitonealmente con 7 semanas de vida bien con 1×10^7 ufp de virus vaccinia (VV) replicativo vivo o 5 µg de VV inactivado con H₂O₂ mezclado con adyuvante MPL según las instrucciones del fabricante. Todos los animales que recibieron virus inactivado recibieron una inyección de recuerdo 21 días después utilizando vacunas idénticas. Los animales fueron sometidos a eutanasia 41 días después de la segunda vacunación (o 62 días después de la infección viva). Se estimularon esplenocitos (1×10^6 /pocillo) con células A20 infectadas con VV (MOI=5, infección 14h, $0,5 \times 10^6$ /pocillo) durante 6 horas en presencia de Brefeldin A para bloquear una secreción de citoquina y optimizar la tinción de la citoquina intracelular (ICCS). Se midieron mediante ICCS las células IFN γ + TNF α + T específicas del virus.

La FIG. 4A ilustra la inducción de respuestas antivirales de células T CD4+ y CD8+ después de la vacunación con virus vaccinia (VV) inactivado con H₂O₂. En la FIG. 4A, las células T fueron controladas primero con CD4 (paneles superiores) o CD8 (paneles inferiores) y los números en el cuadrante derecho superior indican el porcentaje de células T específicas del virus determinado después de una resta del fondo de los pocillos incubados únicamente en medio. Estos datos son representativos de 2-4 ratones analizados en 2 experimentos distintos.

Para confirmar que la respuesta de anticuerpos después de la vacunación con virus vaccinia (VV) inactivado con H₂O₂ era una respuesta de anticuerpo antiviral biológicamente relevante, se vacunaron los ratones BALB/c intraperitonealmente con 7 semanas de vida bien con 1×10^8 ufp de virus vaccinia (VV) replicativo vivo o bien con 5 µg de VV inactivado bien con un 3% de H₂O₂, bien con 1% de formaldehído, bien mediante inactivación con calor (56 °C, 2 horas), o bien mediante luz ultravioleta (luz UV, 10 julios) y fueron administrados adyuvante MPL según las instrucciones del fabricante. Todos los animales que recibieron el virus inactivado fueron sometidos a una inyección de recuerdo 21 días después utilizando vacunas idénticas. Como se muestra en las FIGURAS 4B y C, 41 días después de la segunda vacunación (o 62 días después de la infección viva), se determinaron las respuestas de anticuerpos antivirales a los antígenos de vaccinia. Se determinaron los anticuerpos de neutralización biológicamente relevantes (es decir, anticuerpos capaces de reducir la infectividad del virus) y se muestra (FIG. 4B) la dilución de anticuerpos en suero capaz de reducir el virus infeccioso un 50% (NT₅₀). La inactivación con formaldehído produjo respuestas de anticuerpos deficientes en comparación con otras técnicas de inactivación. La inactivación con luz UV funcionó razonablemente bien, pero no fue tan eficaz como el H₂O₂. La inactivación con calor tuvo como resultado potentes respuestas de anticuerpos según fueron medidas mediante ELISA (FIG. 4C), pero con una actividad neutralizante deficiente, indicando que la mayor parte de la respuesta de anticuerpos se montó contra los epitopos no protectores. La vacuna inactivada con H₂O₂ fue la única vacuna que demostró respuestas de anticuerpos eficaces biológicamente relevantes que imitaban estrechamente la inmunidad inducida por una infección viral viva sistémica.

Ejemplo 5: el H₂O₂ inactiva de forma eficaz una amplia variedad de patógenos

Para confirmar que el H₂O₂ inactiva una amplia gama de patógenos, se midió la viabilidad de varios virus pertenecientes a distintas clases después de la inactivación con H₂O₂. Se inactivaron virus de distintas clases, incluyendo tanto virus ADN o ARN, en 3% de H₂O₂ como se ha descrito anteriormente. Se determinó la viabilidad al medir la titulación viral en células anfitrionas apropiadas mediante ensayo de placas. Como se muestra en la FIG. 5A, se inactivaron de forma eficaz el virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV), el virus de la fiebre amarilla (YFV), el virus del Nilo occidental (WNV), el virus vaccinia (VV) y el virus de la viruela del simio (MPV) mediante un tratamiento con H₂O₂, reduciéndose las titulaciones virales en cada caso hasta por debajo del límite de detección. Como se ha expuesto anteriormente con respecto al virus vaccinia, la capacidad del H₂O₂ para inactivar el virus está presente con una concentración muy baja con independencia de la clase de virus, como se ilustra en la FIG. 5B, que muestra que se elimina la infectividad del LCMV con una concentración inferior al 0,1% de H₂O₂.

Teniendo en cuenta las muchas realizaciones posibles a las que se pueden aplicar los principios de la invención dada a conocer, se debería reconocer que las realizaciones ilustradas son únicamente ejemplos preferentes de la invención y no deberían ser tomadas como limitantes del alcance de la invención. Más bien, el alcance de la invención está definido por las siguientes reivindicaciones. Por lo tanto, los inventores reivindican como su invención todo lo que se encuentra dentro del alcance y del espíritu de estas reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para producir una composición inmunogénica que comprende un patógeno viral inactivado, comprendiendo el procedimiento:
 5 poner en contacto el patógeno viral con una disolución que comprende un agente oxidante en una cantidad y durante un periodo de tiempo suficientes como para hacer al patógeno viral no infeccioso mientras que conserva la inmunogenicidad viral,
 produciendo, de ese modo, una composición de vacuna inmunogénica que comprende un patógeno viral inactivado.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la composición de vacuna es, o fue, liofilizada
 10 subsiguientemente a la inactivación del patógeno viral.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o 2, en el que el agente oxidante comprende peróxido de hidrógeno.
4. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende liofilizar la disolución para eliminar parte, la mayoría, o todo el agente oxidante.
5. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición inmunogénica está
 15 libre de conservante.
6. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se aísla o se purifica el patógeno viral antes de hacer contacto con el agente oxidante.
7. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que las etapas de poner en contacto el
 20 patógeno viral completo con el agente oxidante y de liofilizar la disolución son llevadas a cabo sin una etapa intermedia de purificación.
8. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, siendo el virus un poxvirus, un flavivirus, un
 arenavirus, o un virus vaccinia.
9. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 3-8, en el que se escoge la disolución para que
 comprenda al menos un 0,03%, o no más de un 30%, o un 3% de peróxido de hidrógeno (p/vol).
- 25 10. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que se pone en contacto el patógeno viral completo con la disolución que comprende el agente oxidante durante al menos cinco minutos, o durante al menos 30 minutos, o durante 2 horas.
11. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en el que se pone en contacto el patógeno viral
 30 completo con la disolución que comprende el agente oxidante a una temperatura a 0°C, o superior a la misma, o a una temperatura no superior a 42°C, o a una temperatura de 25°C, a temperatura ambiente, o a 4°C.
12. Una composición inmunogénica producida según el procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1-
 11.
13. Una composición de vacuna que comprende un patógeno viral inactivado oxidado, en la que la composición de
 vacuna está libre de conservantes y libre de cualquier agente de inactivación.
- 35 14. La composición de vacuna según la reivindicación 13, en la que el patógeno viral inactivado conserva uno o más epítomos antigénicos predominantes del patógeno viral biológicamente activo.
15. La composición de vacuna de la reivindicación 13, en la que la composición de vacuna está libre de formaldehído
 y de betapropiolactona.
16. El procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 1-11 o la composición de las reivindicaciones 12-14,
 40 siendo el virus un poxvirus, un flavivirus, un arenavirus, o un virus vaccinia.
17. Un procedimiento para preparar una composición inmunogénica adecuada para ser administrada para suscitar
 en un sujeto una respuesta inmunitaria contra un patógeno viral, comprendiendo el procedimiento preparar una
 composición inmunogénica de virus al poner en contacto un patógeno viral con una disolución que comprende un
 agente oxidante en una cantidad y durante un periodo de tiempo suficientes como para volver al patógeno viral no
 45 infeccioso.
18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el agente oxidante es peróxido de hidrógeno, y comprende,
 además, liofilizar la disolución que comprende peróxido de hidrógeno para producir una composición liofilizada.
19. El procedimiento de la reivindicación 17 o 18, en el que la composición liofilizada tiene la forma de un polvo, un
 microgránulo, o un líquido.

20. El procedimiento de la reivindicación 18, que comprende, además, reconstituir la composición liofilizada en un diluyente farmacéuticamente aceptable.

FIG. 1

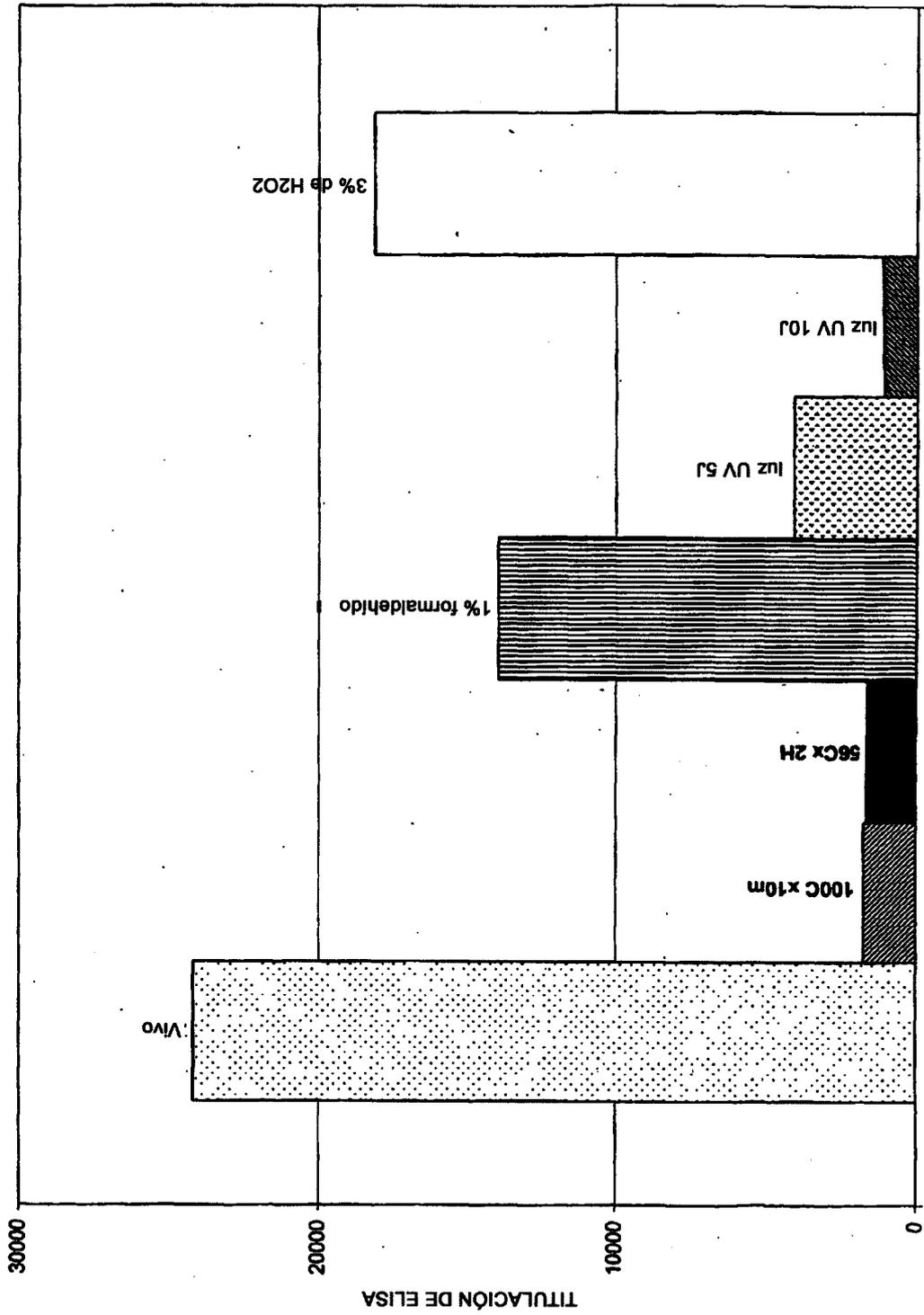


FIG. 2

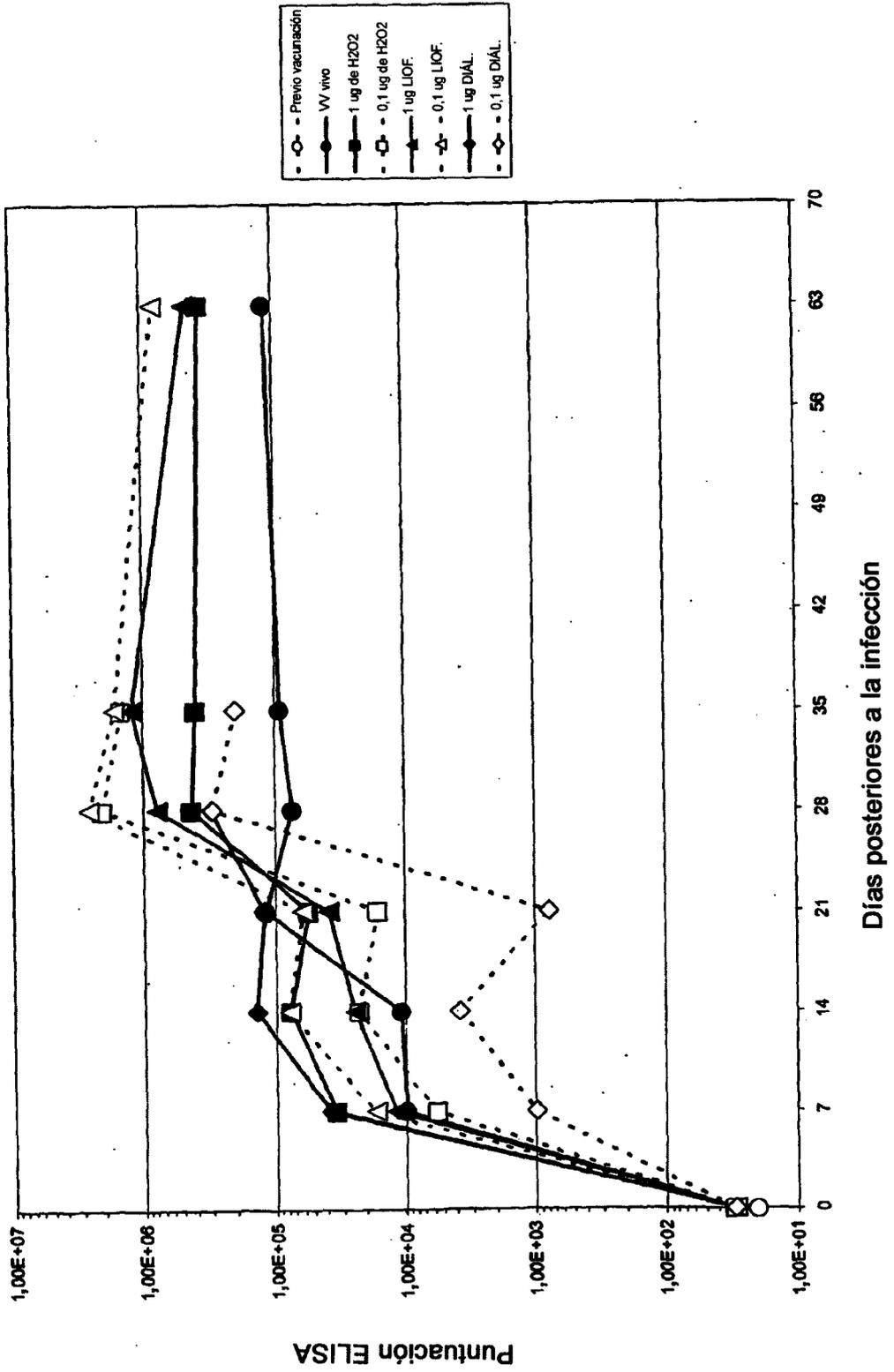


FIG. 3

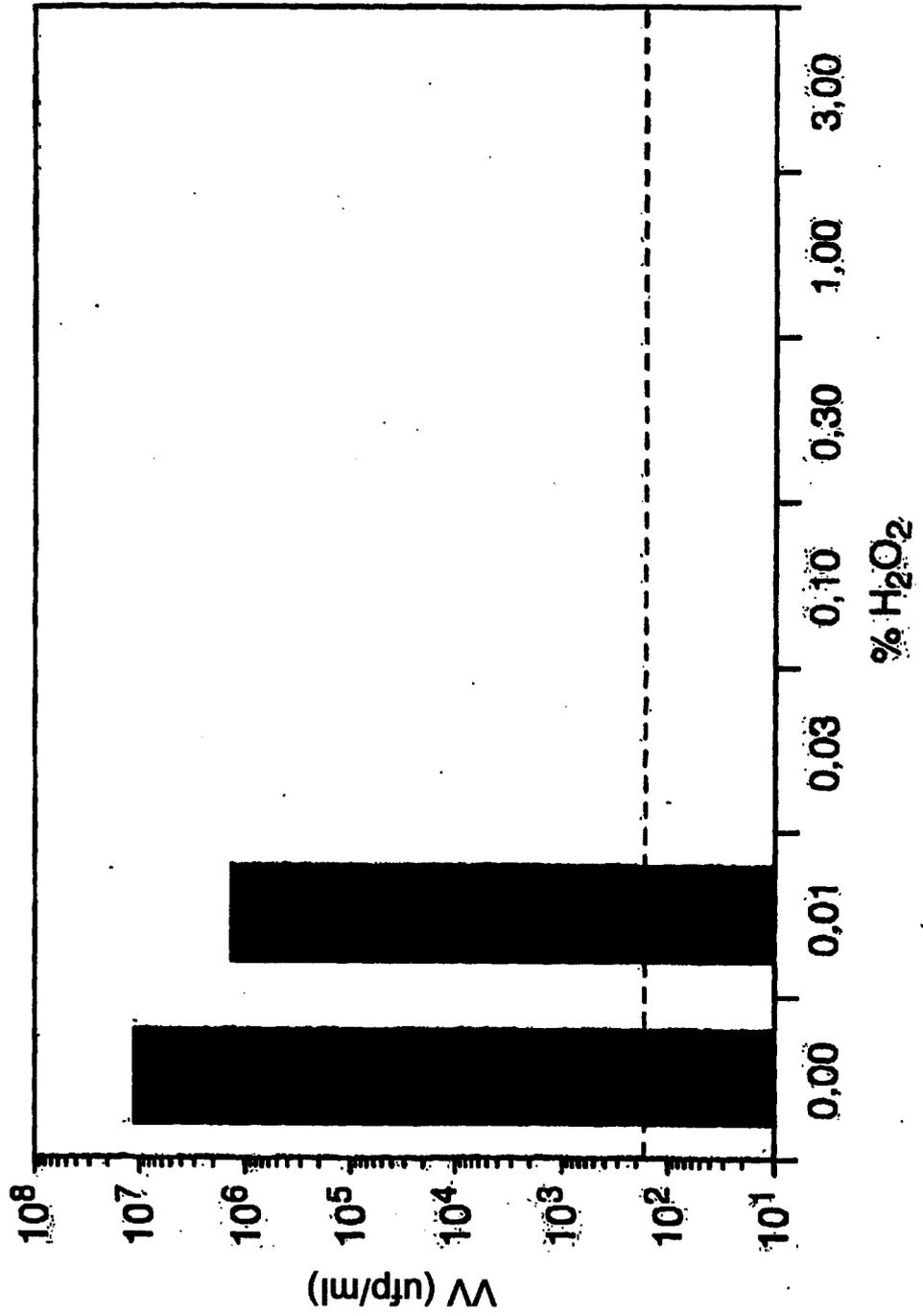


FIG. 4A

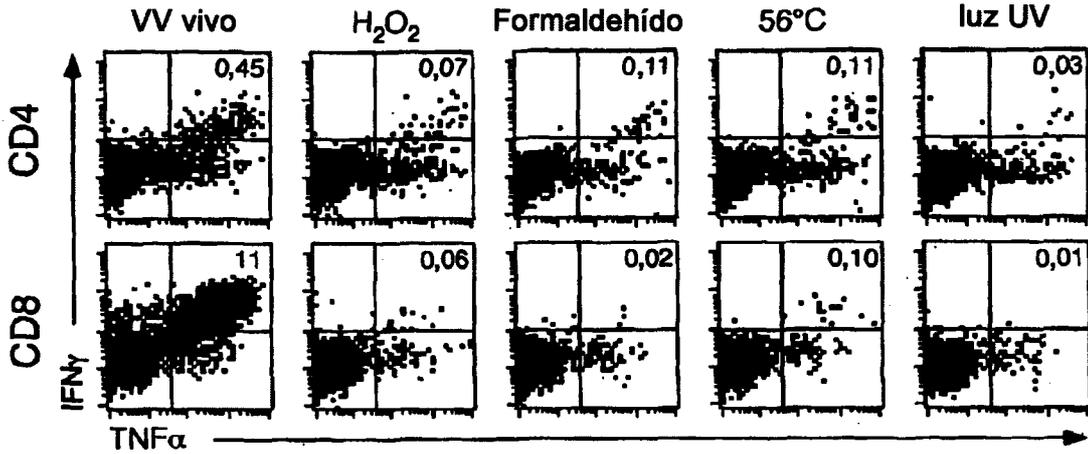


FIG. 4B

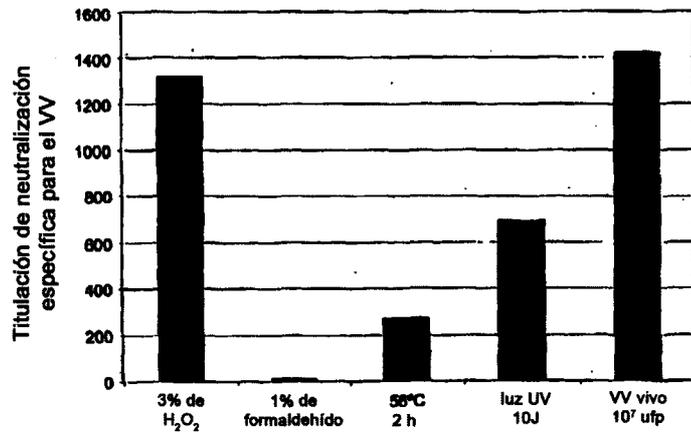


FIG. 4C

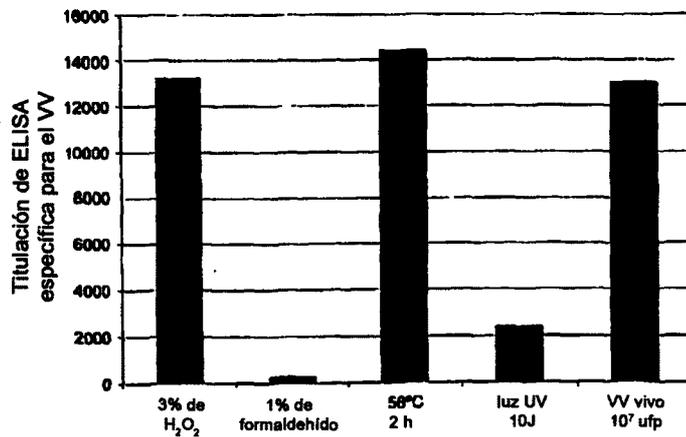


FIG. 5A

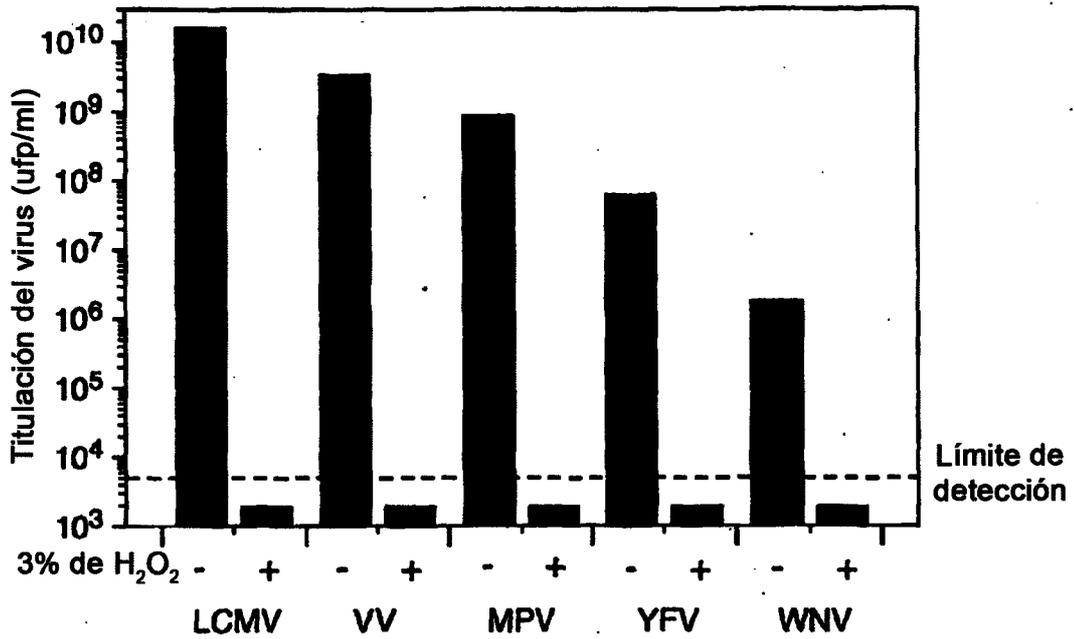


FIG. 5B

