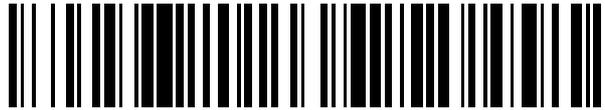


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 531 734**

51 Int. Cl.:

A61K 39/145 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.10.2005 E 05804424 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.12.2014 EP 1796719**

54 Título: **Composiciones de vacuna para la gripe estables a temperaturas de refrigerador**

30 Prioridad:

06.10.2004 US 616711 P

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

18.03.2015

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
One MedImmune Way
Gaithersburg MD 20878 , US**

72 Inventor/es:

**KEMBLE, GEORGE;
TRAGER, GEORGE y
SCHWARTZ, RICHARD**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 531 734 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

Composiciones de vacuna para la gripe estables a temperaturas de refrigerador

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10 Las vacunas frente a diversas y cambiantes cepas de gripe son importantes no solo desde un punto de vista de la de salud de la comunidad, sino también comercialmente, ya que cada año numerosos individuos se infectan con diferentes cepas y tipos de virus de la gripe. Los niños, los ancianos, los que no tienen una atención médica adecuada y las personas inmunocomprometidas tienen un riesgo especial de muerte por este tipo de infecciones. Un agravamiento del problema de las infecciones por gripe es que las cepas de gripe nuevas evolucionan rápidamente, necesitando por ello la producción continua de nuevas vacunas.

15 Se han producido numerosas vacunas capaces de producir una respuesta inmune protectora específica para este tipo de virus de la gripe diferentes durante más de 50 años e incluyen, por ejemplo, vacunas de virus completos, vacunas de virus fraccionados, vacunas de antígenos de superficie y vacunas con virus vivos atenuados. Sin embargo, aunque las formulaciones apropiadas de cualquiera de estos tipos de vacunas son capaces de producir una respuesta inmune sistémica, las vacunas vivas atenuadas de virus también tienen la ventaja de ser capaces de estimular la inmunidad de la mucosa local en el tracto respiratorio. Por lo tanto es bastante deseable una vacuna que comprende un virus vivo atenuado que es capaz de producirse de forma rápida y económica y que es capaz de fácil almacenamiento/transporte. Incluso sería más deseable una vacuna tal que fuera capaz de almacenamiento/transporte a temperaturas de refrigerador (por ejemplo, aproximadamente 2-8 °C).

25 Hasta la fecha, todas las vacunas contra la gripe disponibles en el mercado en Estados Unidos se han propagado en huevos de gallina embrionados. Aunque el virus de la gripe crece bien en huevos de gallina, la producción de la vacuna depende de la disponibilidad de dichos huevos. Debido a que el suministro de huevos se debe organizar, y las cepas para la producción de vacunas se deben seleccionar meses antes de la siguiente temporada de gripe, la flexibilidad de este enfoque se puede limitar, y a menudo da como resultado retrasos y escasez en la producción y la distribución. Por lo tanto, se desean en gran medida métodos para aumentar la estabilidad (por ejemplo, a temperaturas de refrigerador) de la vacuna producida, ya que pueden prevenir el deterioro de las existencias de vacunas, que de otro modo necesitarían nueva producción, etc.

35 En los últimos años también se han desarrollado sistemas para producir virus de la gripe en cultivo celular (Véase, *por ejemplo*, Furminger. Vaccine Production, en Nicholson *et al.* (eds.) Textbook of Influenza pp. 324-332; Merten *et al.* (1996) Production of virus de la gripe in cell cultures for vaccine preparation, en Cohen y Shafferman (eds.) Novel Strategies in Design and Production of Vaccines pp. 141-151); por lo tanto, también se desea en gran medida cualquier método para aumentar la estabilidad de la composición de la vacuna (por ejemplo, almacenamiento/transporte a temperatura de refrigerador) en estos sistemas.

40 Los presentes inventores y colaboradores han realizado un trabajo considerable en la producción de virus de la gripe para la producción de vacunas; véase, *por ejemplo*, la solicitud de Patente de Estados Unidos N° 60/375.675 presentada el 26 de abril de 2002, documento de patente PCT/US03/12728 presentado el 25 de abril de 2003, documento N° 10/423.828 presentado el 25 de abril de 2003, y documento de patente PCT/US05/017734 presentado el 20 de mayo de 2005.

45 La presente invención proporciona composiciones de vacuna que tienen estabilidad, por ejemplo, a temperaturas de refrigerador (por ejemplo, 4 °C) y métodos para producirlas. Los aspectos de la presente invención son aplicables a métodos de producción tradicionales de huevo de gallina y nuevas vacunas en cultivo celular (y también sistemas combinados) y comprenden otros numerosos beneficios que se harán evidentes después de la revisión de lo que sigue a continuación.

50 SUMARIO DE LA INVENCION

55 La presente invención proporciona un método para preparar una composición para la gripe adaptada al frío viva estable en refrigerador tal como se define en la reivindicación 1 y reivindicaciones que dependen de la misma.

60 La presente invención proporciona formulaciones líquidas de vacuna que son básicamente estables a temperaturas que varían de 4 °C a 8 °C. Estas y otras formulaciones líquidas, que son realizaciones específicas de la invención se denominan en el presente documento, por ejemplo, "formulaciones de vacuna de la invención", "formulaciones de vacuna estables en refrigerador", "formulaciones líquidas de la invención", "formulaciones de la invención", "formulaciones de la invención estables a temperatura de refrigerador (RTS)", o simplemente "composiciones de la invención" o "composiciones de virus de la invención".

65 La presente invención enseñar formulaciones líquidas de vacuna que son básicamente estables a temperaturas que varían de 4 °C a 8 °C. En una realización específica de la invención, las formulaciones líquidas de vacuna de la invención son básicamente estables a temperaturas que varían de 4 °C a 8 °C o a 4 °C durante un periodo de 12

meses, o 18 meses, o 24 meses, o 36 meses, o 48 meses, en que existe una pérdida de potencia aceptable (por ejemplo, pérdida de potencia del virus de la gripe), por ejemplo, una pérdida de potencia logarítmica entre 0,5-1,0, o potencia logarítmica inferior a 0,5, o inferior a 1,0, al final de tales periodos de tiempo.

5 En una realización, se proporcionan formulaciones de vacuna estables en refrigerador de la invención que comprenden virus de la gripe vivos. Por ejemplo, las formulaciones de la invención pueden comprender uno o más de los siguientes: un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a la temperatura, un virus de la gripe sensible a la temperatura adaptado al frío atenuado, un virus de la gripe A, y un virus de la gripe B. En una realización, las formulaciones líquidas de vacuna de la invención comprenden dos cepas de virus de la gripe A y una cepa de virus de la gripe B.

La presente invención enseña adicionalmente composiciones inmunogénicas que comprenden formulaciones de la invención. La presente invención enseña adicionalmente vacunas (por ejemplo, vacunas de la gripe) que comprenden formulaciones y composiciones inmunogénicas de la invención.

15 La presente invención incluye adicionalmente métodos para producir tales formulaciones líquidas de vacuna. Por ejemplo, en una realización específica, en el presente documento se proporcionan métodos para producir formulaciones líquidas que comprenden uno o más virus de la gripe. En una realización específica, los métodos para producir una formulación líquida de la invención incluyen una o más de las siguientes etapas: 1) introducir una pluralidad de vectores [uno o más de los que incorporan (o codifican) una porción de un genoma del virus de la gripe] en una población de huevos huésped o en una población de células huésped, cuya población de huevos huésped o células huésped es capaz de apoyar la replicación de virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) adición de un estabilizante (por ejemplo, soluciones que contienen sacarosa y glutamato tal como se describe en el presente documento); 5) clarificar la cosecha viral (por ejemplo, mediante filtración de profundidad o en membrana), produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada; 6) someter la cosecha viral a una etapa de centrifugación (por ejemplo, centrifugación zonal continua, centrifugación de flujo continuo); 7) una etapa de filtración estéril (por ejemplo, uso de filtro de 0,2, o 0,2-0,5 micrómetros (con o sin calentamiento durante la filtración); y 8) almacenamiento a -60 grados C.

20 En otra realización específica, los métodos para producir una formulación líquida de la invención incluyen una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos huésped o en una población de células huésped con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) adición de un estabilizante; 5) clarificar la cosecha viral (por ejemplo, por filtración de profundidad y/o pasando a través de uno o más filtros que varían de 0,2-0,8 micrómetros; o 0,8 o 1,5 micrómetros seguido de 0,2 micrómetros), produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada; 6) someter la cosecha viral a una etapa de centrifugación (por ejemplo, centrifugación zonal continua, centrifugación de flujo continuo); 7) una etapa de filtración estéril (por ejemplo, uso de filtro de 0,2, o 0,2-0,5 micrómetros (con o sin calentamiento durante la filtración); y 8) almacenamiento a -60 grados C.

30 En otra realización específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos huésped o en una población de células huésped con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) clarificar la cosecha viral por filtración, produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada; 5) someter la cosecha viral clarificada a centrifugación (por ejemplo, centrifugación de flujo continuo), produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada adicional; 6) adición de estabilizantes (por ejemplo, sacarosa al 6-8 %; monohidrato de arginina al 1-2 %; ácido glutámico al 0,45-0,1 %, monohidrato monosódico; y hidrolizado de gelatina al 0,5-2 %); y 6) esterilizar dicha cosecha viral clarificada por filtración adicional.

35 En otra realización específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden todas las etapas siguientes: 1) infección de una población de huevos huésped o en una población de células huésped con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) clarificar la cosecha viral por filtración, produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada; 5) someter la cosecha viral clarificada a centrifugación (por ejemplo, centrifugación de flujo continuo), produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada adicional; y 6) esterilizar dicha cosecha viral clarificada por filtración adicional.

40 En otra realización específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos huésped o en una población de células huésped con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) clarificar la cosecha viral; 5) someter la cosecha viral clarificada a centrifugación (por ejemplo, centrifugación de flujo continuo), produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada adicional; y 6) esterilizar dicha cosecha viral clarificada por filtración adicional.

En otra realización específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos huésped o en una población de células huésped con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) clarificar la cosecha viral; y 5) someter la cosecha viral clarificada a diafiltración.

En otra realización específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos huésped o en una población de células huésped con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) clarificar la cosecha viral; 5) someter la cosecha viral clarificada a diafiltración; y 6) adición de estabilizantes (por ejemplo, sacarosa al 6-8 %; monoclóhidrato de arginina al 1-2 %; ácido glutámico al 0,05-0,1 %, monohidrato monosódico; y hidrolizado de gelatina al 0,5-2 %).

Estos y otros objetos y características de la invención se harán más evidentes en su totalidad cuando la siguiente descripción detallada se lea en conjunto con el apéndice de figuras adjuntas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1: Presenta un diagrama de flujo que ilustra un Flujo de Proceso CTM.

Figura 2: Presenta un diagrama de flujo que ilustra un Flujo de Proceso CTM.

Figura 3: Presenta una tabla que ilustra Estudios de Carga en Centrifuga y de Temperatura.

Figura 4: Presenta una tabla que ilustra un Resumen de datos de ensayo QC.

Figura 5: Presenta una tabla que ilustra rendimientos medios para una serie de cepas de gripe.

Figura 6: Presenta una tabla con un resumen de datos de ensayo QC para resultados de ensayo de liberación en masa monovalente.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Los presentes métodos proporcionan formulaciones líquidas de vacuna que son básicamente estables a temperaturas que varían entre 4 °C y 8 °C. En una realización específica de la invención, las formulaciones líquidas de vacuna de la invención son básicamente estables a temperaturas que varían de 4-8 °C o 4 °C durante un periodo de al menos 1 mes, o al menos 2 meses, o al menos 3 meses, o al menos 4 meses, o al menos 5 meses, o al menos 6 meses, o al menos 9 meses, o al menos 12 meses, o al menos 18 meses, o al menos 24 meses, o al menos 36 meses, o al menos 48 meses, en que existe una pérdida de potencia aceptable (por ejemplo, pérdida de potencia del virus de la gripe) al final de dicho periodo de tiempo, por ejemplo, una pérdida de potencia logarítmica entre 0,5-1,0 (tal como se mire, por ejemplo, por $DICT_{50}$ o Ensayo de Foco Fluorescente (FFA)).

La presente invención enseña adicionalmente composiciones inmunogénicas que comprenden formulaciones de la invención. La presente invención enseña adicionalmente vacunas (por ejemplo, vacunas de gripe) que comprenden formulaciones y/o composiciones inmunogénicas de la invención.

De acuerdo con la invención, se proporcionan formulaciones líquidas de vacuna de la invención que comprenden virus de la gripe vivos. Por ejemplo, las formulaciones de la invención pueden comprender una o más de dos siguientes: un virus de la gripe atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío, un virus de la gripe sensible a la temperatura, un virus de la gripe sensible a la temperatura adaptado al frío atenuado, un virus de la gripe A, y un virus de la gripe B. En una realización, las formulaciones líquidas de vacuna de la invención comprenden dos cepas de virus de la gripe A y una cepa del virus de la gripe B.

La presente invención proporciona métodos para producir tales formulaciones líquidas de vacuna. Por ejemplo, en una realización específica, en el presente documento se proporcionan métodos para producir formulaciones líquidas que comprenden uno o más virus de la gripe. En una realización específica, los métodos para producir una formulación líquida de la invención incluyen una o más de las siguientes etapas: 1) introducir una pluralidad de vectores [uno o más de los que incorporan (o codifican) una porción de un genoma del virus de la gripe] en una población de huevos huésped o en una población de células huésped, cuya población de huevos huésped o células huésped es capaz de apoyar la replicación de virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) adición de un estabilizante (por ejemplo, soluciones que contienen sacarosa y glutamato tal como se describe en el presente documento); 5) clarificar la cosecha viral (por ejemplo, mediante filtración de profundidad o en membrana), produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada; 6) someter la cosecha viral a una etapa de centrifugación (por ejemplo, centrifugación zonal continua, centrifugación de flujo continuo); 7) una etapa de filtración estéril (por ejemplo, uso de filtro de 0,2, o 0,2-0,5 micrómetros (con o sin calentamiento durante la filtración); y 8) almacenamiento a -60 grados C.

En otra realización específica, los métodos para producir una formulación líquida de la invención incluyen una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos huésped o en una población de células huésped

5 con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) adición de un estabilizante; 5) clarificar la cosecha viral (por ejemplo, por filtración de profundidad y/o pasando a través de uno o más filtros que varían de 0,2-0,8 micrómetros; o 0,8 o 1,5 micrómetros seguido de 0,2 micrómetros), produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada; 6) someter la cosecha viral a una etapa de centrifugación (por ejemplo, centrifugación zonal continua, centrifugación de flujo continuo); 7) una etapa de filtración estéril (por ejemplo, uso de filtro de 0,2, o 0,2-0,5 micrómetros (con o sin calentamiento durante la filtración); y 8) almacenamiento a -60 grados C.

10 En otra realización específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos huésped o en una población de células huésped con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) clarificar la cosecha viral por filtración, produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada; 5) someter la cosecha viral clarificada a centrifugación (por ejemplo, centrifugación de flujo continuo), produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada adicional; 6) adición de estabilizantes (por ejemplo, sacarosa al 6-8 %; monoclóhidrato de arginina al 1-2 %; ácido glutámico al 0,05-0,1 %, monohidrato monosódico; y hidrolizado de gelatina al 0,5-2 %); y 6) esterilizar dicha cosecha viral clarificada por filtración adicional.

20 En otra realización específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden todas las etapas siguientes: 1) infección de una población de huevos huésped o en una población de células huésped con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) clarificar la cosecha viral por filtración, produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada; 5) someter la cosecha viral clarificada a centrifugación (por ejemplo, centrifugación de flujo continuo), produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada adicional; y 6) esterilizar dicha cosecha viral clarificada por filtración adicional.

30 En otra realización específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos huésped o en una población de células huésped con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) clarificar la cosecha viral; 5) someter la cosecha viral clarificada a centrifugación (por ejemplo, centrifugación de flujo continuo), produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada adicional; y 6) esterilizar dicha cosecha viral clarificada por filtración adicional.

35 En otra realización específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos huésped o en una población de células huésped con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) clarificar la cosecha viral; y 5) someter la cosecha viral clarificada a diafiltración.

40 En otra realización específica, los métodos para producir una composición de virus de la gripe de la invención comprenden una o más de las siguientes etapas: 1) infección de una población de huevos huésped o en una población de células huésped con virus de la gripe; 2) cultivar la población de huevos huésped o población de células huésped a una temperatura apropiada; 3) recuperar virus de la gripe en una cosecha viral; 4) clarificar la cosecha viral; 5) someter la cosecha viral clarificada a diafiltración; y 6) adición de estabilizantes (por ejemplo, sacarosa al 6-8 %; monoclóhidrato de arginina al 1-2 %; ácido glutámico al 0,05-0,1 %, monohidrato monosódico; y hidrolizado de gelatina al 0,5-2 %).

50 En una realización, los métodos para producir una formulación líquida de la invención pueden incluir la etapa de congelar tales formulaciones. La etapa de congelación se puede realizar, por ejemplo, antes del ensayo de estabilidad y distribución final y/o antes del almacenamiento a temperaturas de refrigerador (por ejemplo, 4-8 grados Celsius). La congelación de las formulaciones de vacuna antes del almacenamiento a temperaturas de refrigerador puede aumentar la estabilidad de las formulaciones de vacuna de la invención en al menos un 10 %, o al menos un 20 %, o al menos un 30 %, o al menos un 40 %, o al menos un 50 %, o al menos un 80 %.

55 La invención también proporciona métodos para producir una o más composiciones de virus de la gripe por filtración de una cosecha de virus de gripe, mediante la cual la cosecha de virus se calienta durante la filtración. Incluido en estas realizaciones específicas, la filtración comprende el paso de la composición a través de un microfiltro de un tamaño de poro que varía de 0,2 micrómetros a aproximadamente 0,45 micrómetros. Además, en diversas realizaciones, la temperatura de calentamiento en tales realizaciones comprende opcionalmente de aproximadamente 28 °C a aproximadamente 40 °C o superior, aunque en algunas realizaciones, la temperatura comprende 31 °C o de aproximadamente 30 °C a aproximadamente 32 °C. En tales realizaciones el calentamiento se produce opcionalmente antes o durante o antes o durante la filtración y comprende opcionalmente de aproximadamente 50 minutos a aproximadamente 100 minutos, de aproximadamente 60 minutos a aproximadamente 90 minutos, o aproximadamente 60 minutos. La invención también proporciona una composición

de virus de la gripe producida con tales métodos (incluyendo en la que la composición es una composición de vacuna).

Estabilizantes y tampones

5 Los estabilizantes de la invención incluyen, arginina, 1-2 %; 6-8 % de sacarosa; 0,5-2 % de gelatina hidrolizada; y glutamato (por ejemplo, 0,05-0,1 %).

10 Los tampones de la invención incluyen, por ejemplo, uno o más de los siguientes: tampón de fosfato (mono o dibásico o ambos) (por ejemplo, 10-200 mM, pH 7-7,5; 100 mM, pH 7,2; 100 mM, pH 7-7,3); y tampones de histidina (por ejemplo, histidina 25 - 50 mM, pH 7-7,5, Histidina 50-100 mM, pH 7-7,5).

Rendimiento del Proceso

15 En una realización, los métodos para producir una formulación líquida de la invención dan como resultado un rendimiento del proceso real o medio (desde Cosecha Viral (VH) la formulación final) inferior a un 10 %, inferior a un 16 %, inferior a un 20 %, inferior a un 30 %, inferior a un 40 %, inferior a un 50 %, inferior a un 60 %, inferior a un 70 %, inferior a un 80 %, inferior a un 90 %, o inferior a un 93 %, o inferior a un 95 %.

20 Los expertos en la materia observarán que no es necesario que las diversas etapas de los métodos que se describen en el presente documento se realicen o no es necesario que existan en la misma serie de producción. Por lo tanto, aunque en algunas realizaciones preferentes se realiza o existen todas las etapas y/o composiciones en el presente documento, en otras realizaciones, una o más etapas, por ejemplo, se omiten, cambian (en alcance, orden, colocación, etc.) o similar, opcionalmente con la condición de que el método resultante esté de acuerdo al menos con la reivindicación 1.

25 Los expertos en la materia también observarán que las realizaciones habituales comprenden etapas/métodos/composiciones que son conocidas en la técnica, por ejemplo, inspección visual a contraluz de huevos que contienen virus, inoculación de huevos con virus, etc. Por lo tanto, los expertos en la materia son capaces de determinar fácilmente condiciones apropiadas, subetapas, detalles de etapa, etc., para tales etapas conocidas para producir los virus apropiados, soluciones de virus, composiciones, etc. básicamente estables a 2-8 °C. Las etapas individuales se describen con más detalle a continuación.

35 Además, la presente invención enseñar métodos para usar tales formulaciones líquidas de vacuna. Por ejemplo, las formulaciones de vacuna se pueden administrar a un ser humano con el fin de prevenir o reducir los efectos de una infección viral, por ejemplo, infección por gripe. En un ejemplo, las formulaciones de la invención se administran en forma de una composición inmunogénica para prevenir o reducir los efectos de una infección por virus de la gripe.

Formulaciones de CAIV estables en refrigerador

40 El trabajo anterior del inventor y colaboradores ha dado como resultado el desarrollo de una vacuna para la gripe adaptada al frío, viva, trivalente (CAIV-T, FluMist[®], que se denomina en todo el documento FluMist, pero se debería suponer que es FluMist[®]) administrada mediante pulverización nasal. La invención actual implica el desarrollo de una formulación de CAIV-T, que presenta un aumento del perfil de estabilidad a temperaturas refrigeradas. En el presente documento se proporcionan métodos para producir tales formulaciones mejoradas y pueden incluir una o más de las siguientes etapas: una etapa de filtración estéril para reducir el riesgo de contaminación, ultracentrifugación (por ejemplo, tasa de centrifugación zonal), y diafiltración. Además, en el presente documento se incluye una serie de métodos para producir FluMist líquido y otras formulaciones estables a temperatura de refrigerador (RTS) de la invención.

50 El desarrollo de cepas de CAIV fue asistido por el Dr. John Maassab de la Universidad de Michigan en la década de 1960 quien hizo pasajes en serie de cepas de gripe A y B en células PCK a temperaturas decrecientes hasta que las cepas resultantes mostraron de forma reproducible las propiedades fenotípicas de la adaptación al frío (el virus crece bien a temperaturas reducidas en comparación con el virus de tipo silvestre), sensibilidad a la temperatura (el virus no crecerían a temperaturas elevadas *in vitro*), y atenuación (la replicación del virus se limita en hurones). A través del desarrollo, por ejemplo, por el inventor y colaboradores, estas propiedades se usaron como la base para el desarrollo de una vacuna trivalente anual que refleja las cepas de vacunas diseñadas con CDC durante un año en particular, a través del proceso de recombinación genética a 6:2. Por ejemplo, una cepa de CAIV a 6:2 se produce mediante coinfección *in vitro* del Virus Donante Maestro de la cepa A o B (MDV) con la cepa de gripe de interés en circulación, y selección mediada por anticuerpos de la recombinación apropiada. La recombinación a 6:2 diana contiene genes HA y NA de la cepa en circulación, y los genes restantes del virus donante maestro adaptado al frío (MDV). El recombinante mantiene las propiedades fenotípicas adaptadas al frío que se han descrito anteriormente. El desarrollo adicional de CAIV sea realizado por los inventores y colaboradores. FluMist ha demostrado un perfil seguro y mostró eficacia frente a la estimulación viral y está aprobado para uso farmacéutico comercial en muchas situaciones.

La formulación original de FluMist contenía cosecha del virus (VH) traducida por infección de huevos específicos de pollo libres de patógenos con Semilla de Virus de Trabajo del Fabricante (MWVS) de la cepa seleccionada, seguido de incubación durante dos o tres días, y cosecha del fluido alantoico infectado. VH se estabilizó mediante la adición a 1/10 del volumen de una solución de sacarosa fosfato glutamato (SPG) 10X. El de FluMist trivalente se produjo por combinación de VH a partir de cada una de las tres cepas en las vacunas durante un año dado con fluido alantoico normal (NAF) estabilizado hasta una concentración diana de $7,3 \log_{10} \text{DICT}_{50}/\text{ml}$ de cada cepa. La mezcla resultante se llenó a continuación en pulverizadores equipados con una punta de pulverización que permite la administración intranasal de vacunas de FluMist. Este formato de producto se usó como "FluMist congelado", que se almacenó en una forma congelada. Se observará que el virus MWVS también se pudo producir opcionalmente, por ejemplo, mediante recombinación de plásmidos. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos N° 60/375.675 presentada el 26 de abril de 2002, documento de patente PCT/US03/12728 presentado el 25 de abril de 2003, documento 10/423.828 presentado el 25 de abril de 2003, documento de patente PCT/US05/017734 presentado el 20 de mayo de 2005, y documento de patente US20050186563.

Aunque el FluMist congelado puede servir como una vacuna marcada cuando se congela después de la preparación y se mantiene congelada hasta el momento de su uso, es bastante deseable una forma de FluMist que sea estable para el transporte/almacenamiento a temperaturas de refrigerador. Tales formas "estables a la temperatura de refrigerador" (o RTS) se caracterizan por uno o más (pero no necesariamente todos en cada realización) de los siguientes: retención de estabilidad cuando se distribuye como un líquido refrigerado; se pasan a través de filtros de esterilización (por ejemplo, 0,2 micrómetros) para proporcionar garantía de un producto estéril; tienen contenido reducido de proteína de huevo (por ejemplo, básicamente libres de NAF); han eliminado la necesidad de preparar diluyente de NAF; tienen un volumen reducido de una dosis; y comprenden cualquiera o ambas de arginina y gelatina como excipientes (por ejemplo, como estabilizantes). En determinados aspectos en el presente documento, las formulaciones que tienen una o más de tales características se denominan "FluMist líquido" o RTS o diversos términos similares, para distinguirlas de otras versiones de vacuna de CAIV-T, tales como congeladas. La invención actual presenta éstos y otros aspectos.

En la producción/ensayo de una composición de virus RTS líquida de la invención, se realizaron numerosos lotes de desarrollo. Los lotes de desarrollo variaban de 2000 a 20.000 huevos por lote, aunque los lotes de GMP eran de aproximadamente 10.000 huevos cada uno. Se observará que aunque en el presente documento se proporcionan diversos ejemplos y protocolos para la producción de virus MWVS (por ejemplo, recombinantes), los virus se producen opcionalmente a través de diferentes medios en diferentes realizaciones. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, los virus del presente documento se preparan opcionalmente a través de los protocolos que se muestran en el presente documento, aún que en otras realizaciones, los virus MWVS se preparan opcionalmente, por ejemplo, a través de técnicas de recombinación de plásmidos o de "rescate de plásmidos". Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos N° 60/375.675 presentada el 26 de abril de 2002, documento de patente PCT/US03/12728 presentado el 25 de abril de 2003, documento de patente USSN 10/423.828 presentado el 25 de abril de 2003, documento de patente 10/788.236 presentado el 25 de febrero de 2004, documento de patente PCT/US05/017734 presentado el 20 de mayo de 2005, y documento de patente US20050186563. En consecuencia, tal como se usa en el presente documento "infección de una población de células huésped" incluye células huésped infectadas por virus creado por o durante la recombinación de plásmidos.

En diversas realizaciones, la invención comprende composiciones de virus y vacuna que son básicamente estables, por ejemplo, no muestran pérdidas de potencia inaceptables, por ejemplo, pérdida de potencia logarítmica entre 0,5-1,0, o logarítmica inferior a 0,5, o inferior a 1,0, durante períodos de tiempo seleccionados (por lo general durante al menos 12 meses, durante al menos 13 meses, durante al menos 14 meses, durante al menos 15 meses, durante al menos 16 meses, durante al menos 17 meses, durante al menos 18 meses, durante al menos 19 meses, durante al menos 20 meses, durante al menos 21 meses, durante al menos 22 meses, durante al menos 23 meses, o durante al menos 24 meses, o durante un periodo de tiempo superior a 24 meses, etc.) a temperaturas deseadas (por ejemplo, por lo general 4 °C, 5 °C, 8 °C, de aproximadamente 4 °C a aproximadamente 8 °C o superiores a 2 °C, o entre los intervalos de 2 °C a 4 °C, o entre los intervalos de 2 °C a 8 °C.).

Aunque en el presente documento se usa a modo de ejemplo o se ilustra una serie de aspectos de la invención con FluMist, los principios incluidos en la invención también se pueden aplicar a otras composiciones de virus/vacuna y no se deberían limitar necesariamente a cepas/virus en particular en el presente documento. Por lo tanto, otros virus y vacunas y composiciones de la gripe vivos atenuados están también dentro del alcance de la invención, por ejemplo, los creados a través de medios racionales, por intervención del ser humano, etc. También, otros virus de otras cepas de gripe, etc., tales como cepas de gripe A, cepas de gripe B, cepas de gripe atenuadas y no atenuadas, cepas de gripe adaptadas al frío y no adaptadas al frío, cepas de gripe sensibles a la temperatura y no sensibles a la temperatura, etc. todos están opcionalmente dentro de las realizaciones de la presente invención. Se pueden usar tales otros virus y vacunas, por ejemplo, como nueva vacuna y/o como controles para someter a ensayo otra vacuna en seres humanos o animales, etc. Además, otras composiciones de vacuna viral viva particularmente las que comprenden virus vivos creados en células o huevos de pollo (por ejemplo, virus del sarampión) son realizaciones de la invención. Además, los principios incluidos en la invención también se pueden aplicar ampliamente a composiciones de virus y vacuna que comprenden virus vivos creados en células de mamífero. Véanse, por ejemplo las patentes de Estados Unidos N° 6.244.354; N° 6.146.873; y N° 6.656.720.

Producción de Cosecha de Virus en Masa

La purificación del virus de la gripe adaptado al frío (hubo otros virus similares) y la formulación real de las composiciones son características de RTS, o composiciones de virus, líquidas. La separación del virus de la gripe del fluido alantoico se había practicado como una parte de procesos comerciales para la fabricación de vacunas inactivadas. El método de elección para tal vacuna inactiva ha sido la ultracentrifugación. La ultracentrífuga de flujo continuo a escala comercial llegó a estar disponible en 1969 y se aplicó rápidamente a la preparación de vacunas de gripe inactivadas. Aunque la purificación cromatográfica de virus de gripe vivo sería una alternativa atractiva, aún no se encuentran disponibles procesos a gran escala resistentes que mantengan actividad viral. Se cree que ésto se debe al revestimiento de la membrana y a la naturaleza pleiomórfica de la partícula del virus de la gripe.

Los inventores y colaboradores consiguieron la recuperación de virus vivo (en oposición a virus inactivado) purificado por ultracentrifugación y es una realización de la presente invención. El trabajo adicional demostró la capacidad de la filtración de profundidad como una alternativa comercialmente viable a la centrifugación con cubeta oscilante antes de la ultracentrifugación, y recuperaciones aceptables de virus vivo después de la filtración a través de un filtro de 0,2 micrómetros, y de nuevo ésto es una realización de la presente invención.

En una realización específica, el rendimiento medio del proceso para la etapa de clarificación de VH de los métodos de la invención es de al menos un 30 %, o al menos un 40 %, o al menos un 50 %, o al menos un 60 %, o al menos un 70 %, o al menos un 80 %, o menos un 90 %.

En otra realización específica, el rendimiento medio del proceso para la etapa de ultracentrifugación (por ejemplo, centrifugación zonal) que los métodos de la invención es de al menos un 30 %, o al menos un 40 %, o al menos un 50 %, o al menos un 60 %, o al menos un 70 %, o al menos un 80 %, o menos un 90 %.

En otra realización específica, el rendimiento medio del proceso para la etapa de dilución máxima y filtración estéril de los métodos de la invención este al menos un 30 %, o al menos un 40 %, o al menos un 50 %, o al menos un 60 %, o al menos un 70 %, o al menos un 80 %, o menos un 90 %.

La etapa de ultracentrifugación proporciona el beneficio de la concentración de CAIV. Esto apoya el uso de un volumen administrado menor (0,1 ml por orificio nasal en lugar de 0,25 ml por orificio nasal, por ejemplo, tal como se podría usar para FluMist congelado). Tal volumen reducido es más habitual para productos administrados por vía nasal y puede aumentar la aceptación del consumidor y reducción de pérdidas de producto debido a deglución o un conteo de la vacuna de la nariz. Las titulaciones de cosecha de fluido alantoico infectado para CAIV por lo general se han encontrado entre 8,3 y 9,5 log₁₀DICT₅₀/ml, que es superior a la un orden de magnitud por encima de la concentración del producto diana para el FluMist congelado (7,3 log₁₀ DICT₅₀/ml, o 7,0 log₁₀ DICT₅₀ por dosis). En el caso en el que se incluya una cepa con titulación muy baja en la recomendación de vacunación anual, un FluMist líquido o RTS aumenta las posibilidades de producir una vacuna trivalente de resistencia completa a pesar del aumento de la concentración del virus en el producto final en comparación con el FluMist congelado. El FluMist líquido o RTS se formula opcionalmente hasta una concentración final de 7,7 log₁₀ DICT₅₀/ml, que administra la misma cantidad de virus vivo por dosis como FluMist congelado.

En una realización específica, se proporciona una composición de vacuna para la gripe de baja titulación mediante la cual la titulación viral es inferior a 7,3 log₁₀ DICT₅₀/ml, o inferior a 7,0 log₁₀ DICT₅₀/ml, o inferior a 6,0 log₁₀ DICT₅₀/ml, o inferior a 5,0 log₁₀ DICT₅₀/ml, o inferior a 4,0 log₁₀ DICT₅₀/ml, o inferior a 3,0 log₁₀ DICT₅₀/ml, o inferior a 2,0 log₁₀ DICT₅₀/ml. Tales composiciones de vacuna para la gripe de baja titulación pueden comprender adicionalmente un adyuvante farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, toxina lábil calor de *E. coli* (o fragmentos de la misma), toxina de pertussis, aluminio. Otros adyuvantes incluyen, pero no se limitan a fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, MPL.TM. (monofosforil lípido A 3-O-desacilado; RIBI ImmunoChem Research, Inc., Hamilton, Mont., en la actualidad Corixa), análogos sintéticos de lípido A tales como 529 (Corixa), Stimulon.TM. QS-21 (Aquila Biopharmaceuticals, Framingham, Mass.), IL-12 (Genetics Institute, Cambridge, Mass.), polinucleótidos sintéticos tales como oligonucleótidos que contienen un motivo de CpG (Patente de Estados Unidos N° 6.207.646 (28)), y toxina de cólera (en una forma de tipo silvestre o mutante, por ejemplo, en la que el ácido glutámico en la posición 29 del aminoácido se sustituye con otra aminoácido, preferentemente una histidina, de acuerdo con la Solicitud de Patente Internacional publicada Número WO 00/18434).

En una realización específica, se puede usar diafiltración en la preparación de composiciones de virus de la invención. Por ejemplo, se puede usar diafiltración para concentrar el virus antes de la formulación. Se puede usar diafiltración además de o en lugar de ultracentrifugación.

Después de una fase inicial que se describe posteriormente el presente documento, la producción de cGMP comenzó a la escala de 10.000 huevos por lote. Se prepararon masas de CAIV monovalente purificado de A/Beijing/262/95 (H1N1), A/Sydney/05/97 (H3N2) y B/Ann Arbor/1/94 (tipo B/harbin/7/94) para apoyar posteriores ensayos clínicos. La cepa de B/Ann Arbor se denomina en lo sucesivo en el presente documento tipo B/Harbin/7/94. Por conveniencia, las denominaciones de las cepas a menudo se abrevian (por ejemplo, A/Beijing). La solicitud actual describe de la forma más intensa las etapas del proceso únicas para el FluMist líquido, sin embargo, en el

presente documento también se describen etapas implicadas en ambos o comunes al FluMist tanto líquido como congelado.

Los métodos para la gestión de huevos y preparación de cosecha de virus recién preparada fueron básicamente los mismos en diversas realizaciones de la presente invención (con la excepción de inoculación y cosecha automatizada) para el FluMist congelado como para el FluMist líquido y los expertos en la materia serán conscientes de etapas similares equivalentes que son capaces de usar con la presente invención. En la presente invención, se realizó ultracentrifugación usando una centrífuga zonal CP40Y de Hitachi y un rotor de flujo continuo RP40CT de Tipo D (volumen del rotor = 3,2 l). La cosecha del virus se combinó primero, se estabilizó con sacarosa fosfato glutamato (SPG) para facilitar la filtración, a continuación se pasó a través de un filtro de polipropileno de 5 micrómetros. País que inicia la continuación, el filtrado se cargó en un gradiente de sacarosa de un 10 % a un 60 %, en bandas durante una hora a 40,000 rpm, y se eluyó en fracciones de 100 ml.

Las fracciones que contienen niveles elevados de hemaglutinina (HA) se combinaron, se diluyeron hasta una concentración de sacarosa 0,2 M, y a continuación se filtraron de forma estéril usando un filtro de fluoruro de polivinilideno (PVDF) de 0,2 micrómetros. La CAIV monovalente purificada en masa resultante se congeló en botellas de 1 l a temperaturas inferiores a -60 grados C y se mantuvo para el procesamiento adicional.

Formulación y Relleno

La identificación sistemática de la formulación inicial determinó que la estabilidad en fase líquida de la CAIV purificada a temperaturas refrigeradas era adecuada para una vacuna anual. La gelatina animal hidrolizada añadida al estabilizante SPG de FluMist congelado proporcionó los mejores resultados de estabilidad, con una cepa menos estable y el lote de la campaña de CTM-1 mostrando una pérdida logarítmica de uno sobre 6,9 meses. Los estudios adicionales de desarrollo de formulaciones mostraron que la estabilidad del FluMist líquido se podría haber mejorado adicionalmente mediante el almacenamiento congelado justo después de la preparación, y descongelando antes de la distribución final. La estabilidad de la cepa del peor caso también mejoró mediante la adición de arginina. Aunque las gelatinas animales pueden plantear inquietudes con respecto a la encefalopatías espongiformes transmisibles (TSE), las formulaciones disponibles que carecen de gelatina no conseguían la estabilidad necesaria en todas las realizaciones. Por lo tanto, se escogió la gelatina porcina para algunas de las realizaciones de la formulación de FluMist líquido debido a sus propiedades estabilizantes y al hecho de que no se han informado apariciones de TSE en cerdos. También se cree que las etapas agresivas de procesamiento químico usadas en la hidrólisis del colágeno causan inactivación de proteínas con tamaño priónico.

La CAIV en masa monovalente purificada, congelada se trasladó y la vacuna trivalente se produjo en cGMP para apoyar el ensayo clínico del FluMist líquido. Se realizaron un total de total seis rellenos. La mezcla se realizó a pequeña escala usando un matraz aspirador de vidrio de 4 l, y se rellenaron pulverizadores de vidrio Hypack SCF de Becton Dickinson (BD) (estériles, limpios, fáciles de rellenar) de 0,5 ml usando un relleno/tapón automatizado de INOVA y equipo asociado. La preparación de FluMist líquido equivalente relleno se describe con más detalle a continuación.

Realizaciones de formulación específicas de la invención

De acuerdo con la invención, las formulaciones de vacuna de la invención comprenden en las formulaciones finales: sacarosa: 6-8 % en peso/volumen (p/v); arginina (tal como monoclóhidrato) al 1-2 % en p/v; ácido glutámico, monohidrato monosódico al 0,05-0,1 % en p/v; hidrolizado de gelatina, tal como porcina de Tipo A (u otras fuentes) al 0,5-2 % en p/v; opcionalmente fosfato potásico dibásico al 1-2 %; y fosfato potásico monobásico al 0,25-1 % en p/v.

En una realización específica, las formulaciones de vacuna comprenden uno o más de lo que sigue a continuación: sacarosa: 6,84 % en peso/volumen (p/v); monoclóhidrato de arginina al 1,21 % en p/v; ácido glutámico, monohidrato monosódico al 0,094 en p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de Tipo A (u otras fuentes) al 1 % en p/v; fosfato potásico dibásico al 1,13 %; y fosfato potásico monobásico al 0,48 % en p/v. En otra realización específica, las formulaciones de vacuna comprenden todo lo que sigue a continuación: sacarosa: 6,84 % en peso/volumen (p/v); monoclóhidrato de arginina al 1,21 % en p/v; ácido glutámico, monohidrato monosódico al 0,094 % en p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de Tipo A (u otras fuentes) al 1 % en p/v; fosfato potásico dibásico al 1,13 %; y fosfato potásico monobásico al 0,48 % en p/v.

En otra realización específica, las formulaciones de vacuna comprenden todo lo que sigue a continuación (con una variación de uno o más componentes de un 10 %): sacarosa: 6,84 % en peso/volumen (p/v); monoclóhidrato de arginina al 1,21 % en p/v; ácido glutámico, monohidrato monosódico al 0,094 % en p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de Tipo A (u otras fuentes) al 1 % en p/v; fosfato potásico dibásico al 1,13 %; y fosfato potásico monobásico al 0,48 % en p/v.

En otra realización específica, las formulaciones de vacuna comprenden todo lo que sigue a continuación (con una variación de uno o más componentes de un 10 %): sacarosa: 6,84 % en peso/volumen (p/v); monoclóhidrato de

arginina al 1,21 % en p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de Tipo A (u otras fuentes) al 1 % en p/v. En tales realizaciones, la formulación se encuentra en forma de tampón (por ejemplo, un tampón de fosfato potásico (pH 7,0-7,2)).

5 En otra realización específica, las formulaciones de vacuna comprenden todo lo que sigue a continuación (con una variación de un 1 % de uno o más componentes): sacarosa: 6,84 % en peso/volumen (p/v); monoclóhidrato de arginina al 1,21 % en p/v; ácido glutámico, monohidrato monosódico al 0,094 % en p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de Tipo A (u otras fuentes) al 1 % en p/v; fosfato potásico dibásico al 1,13 %; y fosfato potásico monobásico al 0,48 % en p/v.

10 En otra realización específica, las formulaciones de vacuna comprenden todo lo que sigue a continuación (con una variación de uno o más componentes de un 3 %): sacarosa: 6,84 % en peso/volumen (p/v); monoclóhidrato de arginina al 1,21 % en p/v; ácido glutámico, monohidrato monosódico al 0,094 % en p/v; hidrolizado de gelatina, porcina de Tipo A (u otras fuentes) al 1 % en p/v; fosfato potásico dibásico al 1,13 %; y fosfato potásico monobásico al 0,48 % en p/v.

15 En una realización específica, las formulaciones de la invención pueden contener, por ejemplo, fosfato potásico (por ejemplo, al menos 50 mM, o al menos 100 mM, o al menos 200 mM, o al menos 250 mM) como un tampón o como alternativa, histidina (por ejemplo, al menos 50 mM, o al menos 100 mM, o al menos 200 mM, o al menos 250 mM).

20 *Otras realizaciones específicas de la invención, por ejemplo, dosificación, potencia*

En otra realización específica, se incluyen métodos para administrar las formulaciones de vacuna de la invención por vía intranasal. Por ejemplo, las formulaciones de vacuna de la invención se pueden administrar por vía intranasal en dosis finales de 0,5 ml/dosis; 0,75 ml/dosis; 0,1 ml/dosis; 0,15 ml/dosis; 0,2 ml/dosis; 0,25 ml/dosis; 0,5-0,1 ml/dosis; 0,5 ml-2 ml/dosis; o 0,5-2,5 ml/dosis.

30 En una realización, las formulaciones de vacuna de la invención comprenden aproximadamente 10^7 unidades de foco fluorescente (FFU) o 10^7 DICT₅₀ de cada una de las tres cepas de recombinación diferentes de gripe. En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención comprenden una potencia de 7,0 (+/- 0,5) log₁₀ FFU/dosis (o DICT₅₀/dosis) para cada cepa del virus de la gripe. En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención comprenden una potencia de 7,0 (+/- 0,5) log₁₀ FFU/dosis (o DICT₅₀/dosis) para al menos una cepa del virus de la gripe. En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención tienen una potencia de al menos (o igual a) 6,0 log₁₀ FFU/dosis, 6,5 log₁₀ FFU/dosis, 6,7 log₁₀ FFU/dosis, 6,7 log₁₀ FFU/dosis, 6,8 log₁₀ FFU/dosis, 6,9 log₁₀ FFU/dosis, 7,0 log₁₀ FFU/dosis, 7,1 log₁₀ FFU/dosis, 7,2 log₁₀ FFU/dosis, 7,3 log₁₀ FFU/dosis, 7,4 log₁₀ FFU/dosis, 7,5 log₁₀ FFU/dosis, 7,6 log₁₀ FFU/dosis, 7,7 log₁₀ FFU/dosis, 7,8 log₁₀ FFU/dosis, 7,9 log₁₀ FFU/dosis, 8.1 log₁₀ FFU/dosis, 8,5 log₁₀ FFU/dosis o 8,8 log₁₀ FFU/dosis.

40 La potencia se puede medir mediante DICT₅₀ en lugar de FFU en cada realización de la invención. Un Ensayo de Foco Fluorescente (FFA) es una medida directa de la capacidad infección en la vacuna mientras que DICT₅₀ es una medida indirecta que mide la capacidad de replicación productiva en células MDCK u otras células.

45 En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención tienen una potencia entre 6,5-7,5 log₁₀ FFU por dosis (por ejemplo, por 0,2 ml de dosis).

En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención tienen una potencia de al menos (o igual a) 7,0 log₁₀ DICT₅₀ por dosis, o al menos 6-8 DICT₅₀ por dosis, o al menos 6,4 DICT₅₀ por dosis, o al menos 6,6 log₁₀ DICT₅₀ por dosis.

50 En una realización, las formulaciones de vacuna de la invención tienen un pH de 6,7-7,7, o 6,6, o 6,7, o 6,8, o 6,9, o 7,0, o 7,1, o 7,2, o 7,3, o 7,4, o 7,5, o 7,6, o 7,7.

55 En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención tienen una cantidad no superior a 60 EU/ml de endotoxina, o tienen una cantidad no superior a 200 EU/ml de endotoxina. Por ejemplo, las formulaciones de vacuna de la invención tienen una cantidad inferior o igual a 5 EU/ml de endotoxina. En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención tienen una cantidad inferior o igual a 1,0 EU/7,0 log₁₀ FFU.

60 En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención están libres de uno o más (o todos) los siguientes: micoplasma, retrovirus, virus de la leucosis aviar, y micobacterium (por ejemplo, M. tuberculosis). Los métodos para producir tales formulaciones de la invención pueden comprender la etapa o etapas de someter a ensayo tales impurezas.

65 En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención pueden contener virus de la gripe que tenga genes HA y NA de los tres virus diferentes como en FluMist.

En una realización específica, las formulaciones de la invención comprenden uno o más (o todos) los que siguen a continuación por dosis (por ejemplo, por 0,2 ml de dosis): sacarosa (13,68 mg), fosfato potásico dibásico (2,26 mg), fosfato potásico monobásico (0,96 mg), hidrolizado de gelatina (2,0 mg), clorhidrato de arginina (2.42 mg), y glutamato monosódico (0,188 mg).

5 En una realización específica, las formulaciones de la invención comprenden uno o más (o todos) los que siguen a continuación por dosis (por ejemplo, por 0,2 ml de dosis): sacarosa (13,68 mg), fosfato potásico (100 mM), hidrolizado de gelatina (2,0 mg), clorhidrato de arginina (2,42 mg), y glutamato monosódico (0,188 mg).

10 En otra realización específica, las formulaciones de la invención comprenden un virus de la gripe que comprende la estructura principal genética de uno o más de los siguientes virus de la gripe: virus A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60) y B/Ann Arbor/1/66, el FluMist MDV-A (ca A/Ann Arbor/6/60), el FluMist MDV-B (ca B/Ann Arbor/1/66), estructura principal de la cepa donante A/Leningrad/17, y PR8. En otra realización específica, las formulaciones de vacuna de la invención comprende un virus de la gripe que comprende una secuencia de polipéptidos de HA y de NA (o al menos idéntica en un 90 % o al menos idéntica en un 95 % a tales secuencias) de uno o más de los siguientes:

15 B/Yamanashi; A/New Caledonia; A/Sydney; A/Panama; B/Johannesburg; B/Victoria; B/Hong Kong; A/Shandong/9/93; A/Johannesburg/33/94; A/Wuhan/395/95; A/Sydney/05/97; A/Panama/2007/99; A/Wyoming/03/2003; A/Texas/36/91; A/Shenzhen/227/95; A/Beijing/262/95; A/New Caledonia/20/99; B/Ann Arbor/1/94; B/Yamanashi/166/98; B_Johannesburg_5_99; B/Victoria/504/2000; B/Hong Kong/330/01; B_Brisbane_32_2002; B/Jilin/20/03; un virus de la gripe A H1N1, un virus de la gripe A H3N2, virus de la gripe A H9N2, un virus de la gripe A H5N1; un virus de la gripe B; y una cepa de gripe pandémica (diseñada por WHO o no circulante en la población humana). Véase, *por ejemplo*, el documento de patente US 20050042229.

20 En otro ejemplo específico, las formulaciones de vacuna de la invención son estériles.

25 *Descripción de Etapas Representativas en la Producción de Vacunas*

Para facilitar el análisis y la descripción, se puede considerar que las diversas etapas de la producción de composición de vacuna en general comprenden o entran en cuatro grandes grupos (más o menos similares a la presentación que se ha resumido en los párrafos anteriores previamente). El primer grupo comprende aspectos tales como coinfección, recombinación, selección de recombinantes, y clonación de recombinantes. El segundo grupo comprende aspectos tales como purificación y expansión de recombinantes. El tercer grupo comprende una expansión adicional de los recombinantes en huevos, junto con cosecha y purificación de tales soluciones de virus cosechados. El cuarto grupo comprende la estabilización de soluciones de virus cosechados y ensayos de potencia/esterilidad de las soluciones de virus. Se debe entender, sin embargo, que la división de los aspectos de la invención en las cuatro categorías generales anteriores es únicamente para fines de explicación/organización y no se debería hacer inferencia de la interdependencia de etapas, etc.. Una vez más, se observará que se usan otras etapas (tanto similares como diferentes) opcionalmente con los métodos y composiciones de la invención (por ejemplo, los métodos y composiciones para composiciones de vacuna RTS).

40 Tal como se ha mencionado anteriormente, para facilitar el análisis y la descripción, se puede pensar que las diversas etapas de producción de vacunas comprenden cuatro grandes grupos. El primer grupo comprende aspectos tales como coinfección, recombinación, selección de recombinantes, y clonación de recombinantes.

45 *Grupo 1*

Los aspectos de la producción de composición de vacuna que en el presente documento se clasifican ampliamente como pertenecientes al Grupo 1, comprenden métodos y composiciones relacionados con la optimización de la coinfección de líneas de cultivo celular, por ejemplo, con un virus tonante maestro y uno otros virus más de tipo silvestre para producir específicamente y los re combinados deseados; selección de virus combinados apropiados; y clonación de los virus combinados seleccionados. La recombinación de cepas de virus de gripe es bien conocida por los expertos en la materia. La recombinación tanto del virus de la gripe A como del virus de la gripe B sea usado tanto en cultivo celular como en huevos para producir cepas del virus de combinados. Véase, por ejemplo, Tannock *et al.*, Preparation and characterisation of attenuated cold-adapted influenza A reassortants derived from the A/Leningrad/134/17/57 donor strain, Vaccine (2002) 20: 2082-2090. La recombinación de cepas de la gripe también se ha mostrado con constructos de plásmidos. Véase, por ejemplo, la solicitud de patente de Estados Unidos N° 60/375.675 presentada el 26 de abril de 2002, documento de patente PCT/US03/12728 presentado el 25 de abril de 2003 y Solicitudes de Estados Unidos N° 10/423.828, presentada el 25 de abril de 2003, documento de patente PCT/US05/017734, presentado el 20 de mayo de 2005; y documento de patente US20050186563.

60 En resumen, la recombinación por lo general comprende la mezcla (por ejemplo, en huevos o cultivo celular) de segmentos de genes de diferentes virus. Por ejemplo, los 8 segmentos habituales de cepas del virus de la gripe B se pueden mezclar, por ejemplo, entre una cepa de tipo silvestre que tenga un epítipo de interés y una cepa "donante", por ejemplo, que comprenda una cepa adaptada al frío. La recombinación entre los dos tipos de virus puede producir, entre otros, virus que comprenden la cepa del epítipo de tipo silvestre para un segmento, y la cepa adaptada al frío para los otros segmentos. Desafortunadamente, para crear los recombinante deseados, en

ocasiones es necesario realizar un gran número de recombinaciones. Después de su recombinación, los virus también se pueden seleccionar (por ejemplo, para encontrarlos recombinante es deseados). Los recombinantes deseados se pueden clonar a continuación (por ejemplo, expandir en número).

5 La optimización, selección, y clonación tradicionales de recombinantes deseados para el virus de la gripe B, por lo general se produce por coinfección de cepas de virus en un cultivo celular (por ejemplo, células CEK) seguido de selección con anticuerpos apropiados, por ejemplo, frente al material de uno de los virus precursores, (habitualmente se realiza en huevos), y la nación o expansión de virus, etc. que por lo general se realiza en cultivo celular. Sin embargo, tal recombinación tradicional presenta inconvenientes porque se necesitan miles de recombinaciones para crear la mezcla de segmentos deseada. Cuando se realizan tales recombinaciones, es evidente que el resultado final no son recombinaciones realmente aleatorias. En otras palabras, en los sistemas existen presiones que sesgan el proceso. Sin embargo, para cepas de la gripe A, no parece que tales procesos tengan tal sesgo. Para cepas de gripe A, la coinfección de cepas (por lo general en cultivo de células tal como células CEK) va seguida de selección y relación al mismo tiempo, de nuevo, por lo general en cultivo celular.

15 *Optimización de la Recombinación*

Diversas realizaciones que usan las etapas del Grupo 1 pueden optimizar el proceso de recombinación para reducir el número de recombinaciones necesarias (y de este modo aumentar el rendimiento/estabilidad del proceso de producción de vacunas), etc. Las etapas que usan tales técnicas de optimización por lo general se incorporan con recombinación de cepas del virus de la gripe B y por lo general se realiza en cultivo celular, por ejemplo, células CEK. Véanse, por ejemplo, solicitudes de patente de Estados Unidos N° 10/788.236 y N° PCT/US04/05697 ambas presentadas el 25 de febrero de 2004.

25 Otros métodos de recombinación de virus de la gripe pueden mezclar opcionalmente diluciones de un virus donante maestro (MDV) y un virus de tipo silvestre, por ejemplo, una dilución a 1:5 de cada uno sin importar la concentración de las soluciones respectivas, que a continuación se incuban durante 24 y 48 horas a 25 °C y 33 °C. aunque a menudo tal enfoque es aceptable para las cepas de gripe A, las cepas del virus de la gripe B por lo general no dan resultados positivos con tal protocolo. Por ejemplo, para conseguir la combinación 6:2 apropiada (es decir, 6 genes del MDV y 2 genes, NA y HA del virus de tipo silvestre) se deben realizar miles de recombinaciones.

Selección y Clonación de Recombinaciones

35 Las etapas del Grupo 1 también comprenden selección de virus de la gripe recombinados. Las cepas de gripe A recombinadas son capaces de selección en cultivo celular (por ejemplo, células CEK) o en huevos. Sin embargo, las cepas del virus de la gripe B recombinadas presentan problemas cuando se recombinan en cultivo celular (por ejemplo, cuando se seleccionan para células CEK). Se cree que las células CEK interfieren con el gen M en cepas del virus de la gripe B, reduciendo de este modo la producción global. Diversos métodos de producción de composición de vacunas, véanse, por ejemplo, solicitudes de patente de Estados Unidos N° 10/788,236 y N° PCT/US04/05697 ambas presentadas el 25 de febrero de 2004, usan diferentes etapas para recombinación de virus, por ejemplo, selección, tales etapas se pueden usar opcionalmente para crear virus para la composición de vacuna.

Caracterización de Recombinantes

45 Incluso otros métodos de producción de virus/vacuna usan aplicaciones de un ensayo de electroforesis de polimorfismo/capilar de conformación de una sola hebra de alto rendimiento (SSCP/CE) para determinar el conjunto de genes del virus de gripe usado en el presente documento. Los virus de la gripe contienen 8 segmentos de genes y, tal como se ha descrito anteriormente, la coinfección de una sola célula con dos cepas diferentes de gripe puede producir virus recombinantes con nuevos grupos de genes distintos de cualquier precursor. Por lo tanto, algunos métodos pueden usar un ensayo de SSCP/CE para determinar rápidamente el grupo de segmentos de genes de un gran número de muestras de virus de gripe. Los segmentos de genes virales de gripe se amplifican opcionalmente por RT-PCR usando cebadores marcados con fluorescencia específicos para cada uno de los ocho segmentos. Véase, también, Arvin *et al.* (2000) Clin. Micro. J 38 (2): 839-845.

Prevención de Contaminación Bacteriana

60 Algunos métodos de producción de virus/vacuna pueden comprender etapas para detectar y/o prevenir/detectar contaminación microbiana de huevos en los que se produce virus de gripe. Las estrategias de detección microbiana de la invención son útiles para detección microbiana rápida/de alto rendimiento y, de este modo, al igual que con otras muchas etapas, son útiles para aumentar el rendimiento y opcionalmente la estabilidad de la producción de virus/vacuna.

65 Muchas estrategias actuales para producción de vacunas para la gripe, que se pueden usar opcionalmente con la invención en el presente documento, usan como un componente, el método tradicional para la expansión del virus de la gripe en huevos de pollo fértil libres de patógenos específicos. Se puede producir posible contaminación microbiana en varios puntos en la producción de virus en huevos. Desafortunadamente, los huevos de pollo pueden

presentar algunos microorganismos fuera de sus cáscaras como parte de su flora natural. También es posible que tengan microorganismos encerrados dentro de la cáscara de huevo durante el desarrollo del embrión de pollo. Los huevos de pollo fertilizados se incuban a 37 °C con alta humedad para el desarrollo del embrión, lo que constituye también condiciones de incubación principales para muchos tipos de contaminantes microbianos. Otro momento posible de contaminación microbiana se produce cuando la cáscara se perfora para inocular el huevo. Aunque antes de la inoculación del virus, los huevos a menudo se pulverizan con alcohol, aún existe la oportunidad de que los microorganismos entren en el huevo.

Después de la expansión de los virus de 2 a 3 días en los huevos, la parte superior de la cáscara de huevo por lo general se retira para la cosecha manual del fluido alantoico que contiene virus dentro del huevo. Véase, mencionado anteriormente. Esta cosecha es otro punto en el que se puede originar contaminación microbiana. Desafortunadamente los huevos con tal carga biológica contaminante pueden escapar a la detección, lo que exige la combinación en múltiples botellas para minimizar el rechazo de la totalidad del lote debido a un ensayo de MPA fracasado. Dado que por lo general se usan tres cepas de gripe en la producción de vacunas, se requiere la mezcla de las tres cepas para el volumen final. El ensayo de MPA en proceso (ensayo de pureza microbiológica) se realiza, por ejemplo, en la cosecha de virus antes de su uso en la mezcla y llenado para asegurar que producto libre de microbios.

Después de la incubación, se usa el método "tradicional" de inspección visual a contraluz para identificar los huevos infértiles y muertos que mueren posiblemente debido a causas naturales o debido a contaminación microbiana (es decir, los huevos muertos se pueden producir debido a la capacidad infección del virus y/o expansión de microorganismos, ambos de los cuales requieren la detección y eliminación de tales huevos). La inspección visual a contraluz comprende, por ejemplo, el proceso de mantener un huevo frente a una fuente de luz en una habitación oscurecida para permitir la visualización del embrión en desarrollo. Los huevos muertos se excluyen de la inoculación del virus.

Tal como se puede observar a partir de los puntos anteriores, se puede necesitar detección de la contaminación microbiana en múltiples etapas durante la preparación de vacuna para la gripe. Existe una necesidad de eliminar o reducir microbios aviares y ambientales y una necesidad de eliminar o reducir la introducción de microbios ambientales y humanos. Los métodos actuales para detección de microorganismos contaminantes incluyen, por ejemplo, métodos de compendio (MPA y Carga Bacteriana). Los métodos actuales pueden incluir, por ejemplo, inspección visual a contraluz del huevo durante la pre/post inoculación del huevo (que por lo general se realiza manualmente a una tasa de aproximadamente 500 huevos/hora/persona); los ensayos de MPA y Carga Bacteriana que por lo general son manuales y necesitan aproximadamente 14 días para MPA y aproximadamente 3 días para Carga Bacteriana (que se realizan durante la cosecha del virus); ensayo de micoplasma; que por lo general se realiza manualmente y necesita aproximadamente 28 días (realizado durante la cosecha del virus); y ensayo de micobacterium que por lo general es manual y necesita aproximadamente 56 días (realizado durante la cosecha del virus). De nuevo, véase, por ejemplo, las solicitudes de Patente de Estados Unidos N° 10/788.236 y N° PCT/US04/05697 ambas presentadas el 25 de febrero de 2004, para descripciones de diversas técnicas capaces de usar la presente invención.

Grupo 2

Aspectos de la producción de virus/vacuna que entran en el Grupo 2 incluyen purificación y expansión de virus adicionales, etc. Después del proceso de recombinación correcta y clonación de recombinantes (es decir, los virus 6:2); tales partículas de virus recombinados se purifican adicionalmente en huevos de gallina embrionados y los clones correctos se expanden en cantidad (de nuevo a través del crecimiento de huevos de gallina) para generar una cepa de virus maestro (MVS) o semilla de virus maestro, que, a su vez, se expande adicionalmente para generar una cepa de virus de trabajo maestro (MWVS) o semilla de virus de trabajo del fabricante. Los expertos en la materia conocen bien muchos aspectos de purificación de partículas de virus a partir de huevos y uso de tales virus purificados para inocular más huevos con el fin de expandir la cantidad de partículas de virus. Muchas de estas técnicas son comunes en la producción actual de partículas de virus y se han usado durante al menos 40 años. Véase, por ejemplo, Reimer, *et al.* Influenza virus purification with the zonal ultracentrifuge, Science 1966, 152: 1379-81. Los protocolos de purificación pueden implicar, por ejemplo, ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (por ejemplo, sacarosa al 10-40 %), etc. Además, tal como se indica en el presente documento, otros procedimientos, etc. enumerados en otros Grupos también pueden estar opcionalmente presentes dentro del Grupo 2, por ejemplo, prevención de la contaminación microbiana, etc.

Grupo 3

Aspectos de la producción de virus/vacuna que entran dentro del título Grupo 3 incluyen, por ejemplo, acondicionamiento de los huevos embrionados (por ejemplo, manipulación específica y condiciones ambientales implicadas en la incubación de huevos infectados con virus) y la cosecha y clarificación del virus de la gripe a partir del fluido alantoico de los huevos.

Por ejemplo, acondicionamiento, lavado, inspección visual a contraluz, e incubación de guapos que contienen los virus recombinados a usar en una vacuna; inoculación, sellado, etc. de tales huevos; inspección visual a contraluz de tales huevos; cosecha de la solución de virus (por ejemplo, el fluido alantoico o Cosecha Viral (VH)) de los huevos; y clarificación de la solución virus, todos pueden entrar dentro de tal categoría. De nuevo, se debería indicar que varias técnicas aplicables a las etapas de los Grupos 2 se pueden aplicar del mismo modo a las etapas del Grupo 3 (por ejemplo, inspección visual a contraluz, etc.). Los expertos en la materia conocen bien varios aspectos de la producción de virus/vacuna que comprenden los Grupos 3. Diversos aspectos de la inspección visual a contraluz de huevos en la producción de virus, así como inoculación de huevos con virus y lavado, incubación, etc. de tales huevos son técnicas bien conocidas en la producción de virus/vacunas en huevos. Por supuesto, se observará que tales técnicas bien conocidas se usan en conjunto con los aspectos únicos e innovadores de la presente invención. Véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente de Estados Unidos N° 10/788.236 y N° PCT/US04/05697 ambas presentadas el 25 de febrero de 2004, que proporcionan etapas adicionales tales como balanceo, etc. que también se pueden usar con los métodos y composiciones de la presente invención. Otras etapas similares pueden incluir filtración y calentamiento específicos de composiciones, de nuevo, véase lo mencionado anteriormente.

Filtrado y Calentamiento

La presente invención implica aspectos de ultracentrifugación, véase anteriormente, que pueden entrar dentro del grupo actual. Además, las solicitudes de patente de Estados Unidos N° 10/788.236 y N° PCT/US04/05697 ambas presentadas el 25 de febrero de 2004 también proporcionan otras etapas de filtrado y calentamiento que se pueden usar opcionalmente con los métodos y composiciones de la presente invención. Tal como se describe, el proceso de preparación de FluMist™ puede usar huevos de pollo embrionados para generar semillas de virus maestro (MVS), semillas de virus de trabajo del fabricante (MWVS) y cosechas de virus (VH). Las semillas y la cosecha viral pueden contener carga bacteriana (por lo general contaminación bacteriana), que pueden hacer que la semilla o lotes de producto de virus en masa se rechacen en el proceso de producción de vacunas. Por supuesto, se observará que el listado o descripción específicos de tipos de productos usados en particular, tamaños, etc., no se va a considerar limitante de la presente invención a menos que se indique específicamente de otro modo.

Grupo 4

El Grupo 4 de los aspectos de la producción de formulación/composición de vacuna comprende, por ejemplo, etapas que se refieren principalmente a la estabilización (por ejemplo, a través de la adición de componentes, alteraciones en relaciones de tampón/NAF, etc.) y ensayos de potencia/esterilidad de soluciones que contienen virus. La descripción de la presente invención anterior, proporciona diversos aspectos que se pueden agrupar opcionalmente dentro de la categoría actual. Véase, anterior.

En algunas realizaciones, las soluciones/vacunas virales finales que comprenden virus vivos son estables en forma líquida durante un periodo de tiempo suficiente para permitir el almacenamiento "en el campo" (por ejemplo, venta y comercialización cuando se refrigeran a 2-8 °C, 4 °C, 5 °C, etc.) durante toda una temporada de vacunación para la gripe (por ejemplo, por lo general desde aproximadamente septiembre a marzo en el hemisferio norte). Por lo tanto, se desea que las composiciones de virus/vacuna mantengan su potencia o pierdan su potencia a una tasa aceptable durante el periodo de almacenamiento. En otras realizaciones, tales soluciones/vacunas son estables en forma líquida de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C, por ejemplo, temperatura de refrigerador. Por ejemplo, si era aceptable una pérdida de potencia logarítmica de 0,3 y el periodo de almacenamiento era de 9 meses, entonces sería aceptable una disminución de la potencia de 0,05 log/mes. Como otro ejemplo, si se permitiera una pérdida logarítmica de hasta 0,75, una tasa inferior o igual a 0,09 log/mes sería suficiente para permitir la estabilidad de los materiales almacenados continuamente a temperatura de refrigerador (por ejemplo, 4 °C). En otras realizaciones, tales soluciones/vacunas son estables en forma líquida cuando se almacenan de aproximadamente 2°C a aproximadamente 8 °C. La estabilidad de la composición que comprender, entre aproximadamente 12 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 13 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 14 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 15 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 16 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 17 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 18 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 19 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 20 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 21 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 22 meses y aproximadamente 2 años, entre aproximadamente 23 meses y aproximadamente 2 años, o más de aproximadamente 2 años.

Se puede someter a ensayo la estabilidad de una formulación de la invención mediante una serie de métodos. Por ejemplo, primero se puede incubar una formulación a temperaturas de congelación (por ejemplo, -25 o -70 °C (+/- 10, 20, 30, o 40 °C) y a continuación almacenar (o "incubar") la formulación a 4-8 °C durante un periodo de tiempo. Como alternativa, se puede someter a ensayo la estabilidad de la formulación de la invención simplemente por almacenamiento (o "incubación") de la formulación a 4-8 °C durante un periodo de tiempo. Se podría medir la potencia mediante una serie de métodos tal como se describe en el presente documento o como se conoce de otro modo.

Concentración/Diafiltración de cosechas de virus

En algunos métodos de producción de composición de vacuna, las cosechas de virus se concentran opcionalmente usando una columna apropiada. Véanse, las solicitudes de patente de Estados Unidos N° 10/788.236 y N° PCT/US04/05697 ambas presentadas el 25 de febrero de 2004.

Estabilizantes/Tampones

La producción de composición de vacuna también puede incluir opcionalmente diversas diluciones de NAF (por lo general NAF sin fraccionar) que comprende el virus de interés y combinaciones, por ejemplo, de sacarosa, arginina, gelatina, EDTA, etc. Véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente de Estados Unidos N° 10/788.236 y N° PCT/US04/05697, para ejemplos de diversas combinaciones posibles en diferentes formulaciones de vacuna. Tales métodos y composiciones son preferentemente estables, por ejemplo, no muestran pérdidas de potencia inaceptables, por ejemplo, una pérdida de potencia logarítmica de 0,5-1,0, o inferior a 0,5 logs, o inferior a 1,0 logs, durante periodos de tiempo seleccionados (por lo general, al menos 12 meses, al menos 15 meses, al menos 18 meses, al menos 24 meses, etc.) a temperaturas deseadas (por ejemplo, por lo general 4 °C, 5 °C, 8 °C, de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C o superior a 2 °C, etc.).

Las formulaciones, composiciones comprenden un estabilizante que comprende arginina (de pH de aproximadamente 7,0 a aproximadamente 7,2), en combinación con hidrolizado de gelatina). Véanse las solicitudes de patente de Estados Unidos N° 10/788.236 y N° PCT/US04/05697. Además, en muchas soluciones de virus/soluciones de vacuna se usaba opcionalmente una solución base de SPG (sacarosa, fosfato potásico y glutamato monosódico).

Las solicitudes de patente de Estados Unidos N° 10/788.236 y N° PCT/US04/05697 ambas presentadas el 25 de febrero de 2004 proporcionan otros métodos adicionales de estabilización de composición de virus/vacuna, por ejemplo, manipulación del nivel de NAF, etc.

Definiciones

A menos que se defina de otro modo, se entiende que todos los términos científicos y técnicos tienen el mismo significado como se usa habitualmente en la técnica a la que pertenecen. Para el fin de la presente invención los siguientes términos se definen a continuación.

Las expresiones "ácido nucleico", "polinucleótido", "secuencia de polinucleótidos" y "secuencia de ácidos nucleicos" se refieren a polímeros de desoxirribonucleótidos o ribonucleótidos monocatenarios o bicatenarios, o quimeras o análogos de los mismos. Tal como se usa en el presente documento, la expresión incluye opcionalmente polímeros de análogos de nucleótidos de origen natural que tienen la naturaleza esencial de los nucleótidos naturales en que se hibridan a ácidos nucleicos monocatenarios de una manera similar a los nucleótidos de origen natural (*por ejemplo*, ácidos nucleicos peptídicos). A menos que se indique de otro modo, una secuencia de ácidos nucleicos en particular incluye opcionalmente secuencias complementarias, además de la secuencia indicada de forma explícita.

El término "gen" se usa ampliamente para hacer referencia a cualquier ácido nucleico asociado con una función biológica. Por lo tanto, los genes incluyen secuencias de codificación y/o las secuencias reguladoras necesarias para su expresión. El término "gen" se aplica a una secuencia genómica específica, así como a un ADNc o un ARNm codificado por esa secuencia genómica.

Los genes también incluyen segmentos de ácidos nucleicos no expresados que, por ejemplo, forman secuencias de reconocimiento para otras proteínas. Las secuencias reguladoras no expresadas incluyen "promotores" y "potenciadores", a los que se unen proteínas de regulación tales como factores de transcripción, dando como resultado la transcripción de secuencias adyacentes o cercanas. Un promotor o potenciador "específico de tejido" es uno que regula la transcripción en un tipo de tejido o tipo de célula específicos, o tipos.

El término "vector" se refiere a los medios mediante los cuales un ácido nucleico se puede propagar y/o transferir entre organismos, células, o componentes celulares. Los vectores incluyen plásmidos, virus, bacteriófagos, provirus, fagémidos, transposones, y cromosomas artificiales, y similares, que se replican de forma autónoma o se pueden integrar en un cromosoma de una célula huésped. Un vector también puede ser un polinucleótido de ARN desnudo, un polinucleótido de ADN desnudo, un polinucleótido formado tanto por ADN como por ADN dentro de la misma hebra, un ADN o ARN conjugado con poli-lisina, un ADN o ARN conjugado con péptido, un ADN conjugado con liposoma, o similares, que no se replican de forma autónoma. Más habitualmente, pero no necesariamente de forma exclusiva, los vectores del presente documento se refieren a plásmidos.

Un "vector de expresión" es un vector, tal como un plásmido que es capaz de estimular la expresión, así como la replicación de un ácido nucleico incorporado en el mismo. Por lo general, el ácido nucleico a expresar está "unido de forma operativa" a un promotor y/o potenciador, y se somete a control regulador de la expresión por el promotor y/o potenciador.

Un "vector de expresión bidireccional" se caracteriza por dos promotores alternativos orientados en la dirección opuesta a un ácido nucleico situado entre los dos promotores, de modo que la expresión se puede iniciar en ambas orientaciones dando como resultado, por ejemplo, la transcripción de ARN de hebra tanto positiva (+) o sentido, como de era tanto negativa (-) o antisentido.

En el contexto del presente documento, el término "aislado" se refiere a un material biológico, tal como un ácido nucleico o una proteína, que está básicamente libre de componentes que normalmente le acompañan o interactúan con él en su entorno de origen natural. El material aislado comprende opcionalmente material no encontrado con el material en su entorno natural, por ejemplo, una célula. Por ejemplo, si el material está en su entorno natural, tal como una célula, el material se ha colocado en una ubicación en la célula (*por ejemplo*, genoma elemento genético) no nativo para un material encontrado en ese entorno. Por ejemplo, un ácido nucleico de origen natural (por ejemplo, una secuencia de codificación, un promotor, un potenciador, etc.) se llega a aislar si se introduce por medios de origen natural en un sitio del genoma (*por ejemplo*, un vector, tal como un vector de plásmido o de virus, o amplicón) no nativo para ese ácido nucleico. Tales ácidos nucleicos también se denominan ácidos nucleicos "heterólogos".

El término "recombinante" indica que el material (por ejemplo, un ácido nucleico o proteína) se ha alterado de forma artificial o sintética (no natural). La alteración se puede realizar en el material dentro, o retirar de, su entorno o estado natural. De forma específica, cuando se hace referencia a un virus, *por ejemplo*, un virus de la gripe, es recombinante cuando se produce mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante.

El término "recombinante", cuando se refiere a un virus, indica que el virus incluye componentes genéticos y/o polipeptídicos derivados de más de una cepa o fuente viral precursora. Por ejemplo, un recombinante 7:1 incluye 7 segmentos del genoma viral (o segmentos de genes) derivados de un primer virus precursor, y un solo segmento del genoma viral complementario, por ejemplo, que codifica hemaglutinina o neuraminidasa, de un segundo virus precursor. Un recombinante 6:2 incluye 6 segmentos del genoma, lo más habitualmente los 6 genes internos de un primer virus precursor, y dos segmentos complementarios, *por ejemplo*, hemaglutinina y neuraminidasa, de un virus precursor diferente.

El término "introducido" cuando se hace referencia a un ácido nucleico heterólogo o aislado se refiere a la incorporación de un ácido nucleico en una célula eucariota o procariota cuando el ácido nucleico se puede incorporar en el genoma de la célula (*por ejemplo*, cromosoma, plásmido, plástido o ADN mitocondrial), convertido en un replicón autónomo, o expresado de forma transitoria (por ejemplo, ARNm transfectado). El término incluye métodos tales como "infección", "transfección", "transformación", y "transcripción". En el contexto de la invención, se puede usar una diversidad de métodos para introducir ácidos nucleicos en células procariotas, que incluyen electroporación, precipitación con fosfato cálcico, transfección mediada por lípidos (lipofección), etc.

El término "célula huésped" se refiere a una célula que contiene un ácido nucleico heterólogo, tal como un vector, y apoyar la replicación y/o expresión del ácido nucleico. Las células huésped pueden ser células procariotas tales como células de *E. coli*, o células eucariotas tales como células de levadura, insecto, anfibio, aves o mamífero, incluyendo células humanas. Las células huésped a modo de ejemplo en el contexto de la invención incluyen células Vero (riñón de mono verde africano), células BHK (riñón de cría de hámster), células primarias de riñón de pollo (PCK), células de Riñón Canino Madin-Darby (MDCK), células de Riñón Bovino Madin-Darby (MDBK), células 293 (*por ejemplo*, células 293T), y células COS (*por ejemplo*, células COS1, COS7).

Virus de la Gripe

Las composiciones y métodos del presente documento se refieren principalmente a la producción de virus de la gripe para vacunas. Los virus de la gripe se preparan a partir de un núcleo interno de ribonucleoproteína que contiene un genoma de ARN monocatenario segmentado y una envoltura de lipoproteína externa revestida por una proteína de la matriz. Cada uno de los virus de la gripe A y la gripe B contiene ocho segmentos de ARN de sentido negativo monocatenario individual. El genoma de la gripe A codifica once polipéptidos. Los segmentos 1-3 codifican tres polipéptidos, lo que representa una ARN polimerasa dependiente de ARN. El segmento 1 codifica la proteína PB2 del complejo de polimerasas. Las proteínas de polimerasa restantes PB1 y PA están codificadas por el segmento 2 y el segmento 3, respectivamente. Además, el segmento 1 de algunas cepas de gripe codifica una proteína pequeña, PB1-F2, producida a partir de un marco de lectura alternativo dentro de la región de codificación de PB1. El segmento 4 codifica la glicoproteína de superficie de hemaglutinina (HA) implicada en la unión celular y la entrada durante la infección. El segmento 5 codifica el polipéptido de nucleoproteína (NP) de la nucleocápside, el componente estructural principal asociado con el ARN viral. El segmento 6 codifica una glicoproteína de envoltura de neuraminidasa (NA). El segmento 7 codifica dos proteínas de la matriz, denominadas M1 y M2, que se traducen a partir de ARNm empalmados de forma diferencial. El segmento 8 codifica NS1 y NS2, dos proteínas no estructurales, que se traducen a partir de variantes de ARNm empalmados de forma alternativa.

Los ocho segmentos del genoma de la gripe B codifican 11 proteínas. Los tres genes más largos codifican componentes de la ARN polimerasa, PB1, PB2 y PA. El segmento 4 codifica la proteína HA. El segmento 5 codifica NP. El segmento 6 codifica la proteína NA y la proteína NB. Ambas proteínas, NB y NA, se traducen a partir de marcos de lectura superpuestos de un ARNm biscistrónico. El segmento 7 de la gripe B también codifica proteínas:

M1 y M2. El segmento más pequeño codificados productos, NS1 que se traduce a partir del ARN de longitud completa, y NS2 que se traduce partir de una variante empanada de ARNm.

Vacuna para el virus de la gripe

Históricamente, las vacunas de virus de la gripe se han producido principalmente en huevos de gallina embrionados usando cepas de virus seleccionados en base a predicciones empíricas de cepas relevantes. Más recientemente, se han producido virus recombinantes que incorporan antígenos de hemaglutinina y neuraminidasa seleccionados en el contexto de una cepa maestro sensible a la temperatura, atenuada y aprobada. Tras el cultivo del virus a través de múltiples pases en huevos de gallina, los virus de la gripe se recuperan y, opcionalmente, se inactivan, por ejemplo, usando formaldehído y/o β -propiolactona (o como alternativa se usan en vacunas atenuadas vivas).

Sin embargo, la producción de vacuna para la gripe de esta manera tiene varias preocupaciones significativas. Por ejemplo, los contaminantes restantes de los huevos de gallina pueden ser muy antigénicos y/o pirogénicos, y con frecuencia pueden dar como resultado efectos secundarios significativos después de la administración. Por lo tanto, otro método consiste en la sustitución de un porcentaje de los componentes del huevo con medios libres de animales. De forma más importante, las cepas del virus diseñadas para la producción de vacunas se debe seleccionar y distribuir, por lo general meses antes de la siguiente temporada de gripe para dar tiempo a la producción e inactivación de la vacuna para la gripe. Una vez más, es bastante deseable, por lo tanto, cualquier mejora de la estabilidad en el tiempo de almacenamiento y/o de almacenamiento a una temperatura más conveniente (por ejemplo, temperatura del refrigerador de aproximadamente 2-8 °C, *por ejemplo*, tal como a través del uso de los métodos y composiciones de la presente invención).

Los intentos para producir vacunas recombinantes y recombinantes en cultivo celular se han visto obstaculizados por la incapacidad de algunas de las cepas aprobadas para producción de vacunas para crecer de forma eficaz en condiciones convencionales de cultivo celular. Por lo tanto, el trabajo previo por parte del inventor y sus colaboradores proporcionó un sistema vector, y métodos para producir virus recombinantes y recombinados en cultivo haciendo posible, por lo tanto, que se produjeran rápidamente vacunas que corresponden a una o muchas cepas antigénicas de virus seleccionadas. Véase, *por ejemplo*, la solicitud de patente de Estados Unidos N° 60/375.675 presentada el 26 de abril de 2002, documento de patente PCT/US03/12728 presentado el 25 de abril de 2003 y documento de patente USSN 10/423.828 presentado el 25 de abril de 2003, documento de patente PCT/US05/017734 presentado el 20 de mayo de 2005. Por supuesto, tales recombinaciones se amplifican opcionalmente de forma adicional en huevos de gallina. Por lo general, los cultivos se mantienen en un sistema, tal como una incubadora de cultivo celular, con humedad controlada y CO₂, a temperatura constante usando un regulador de temperatura, tal como un termostato para asegurar que la temperatura no supere los 35 °C. Tal trabajo pionero, así como otra producción de vacuna, se puede optimizar adicionalmente a través del uso de la presente invención en su totalidad o en parte.

Los virus de la gripe recombinantes se pueden obtener fácilmente por introducción de un subconjunto de vectores que corresponden a segmentos genómicos de un virus de la gripe maestro, en combinación con segmentos complementarios derivados de cepas de interés (por ejemplo, las variantes antigénicas de interés). Por lo general, las cepas maestras se seleccionan en base a propiedades deseables relevantes para la administración de vacunas. Por ejemplo, para la producción de vacunas, *por ejemplo*, para la producción de una vacuna viva atenuada, la cepa del virus donante maestro se puede seleccionar para un fenotipo atenuado, adaptación al frío y/o sensibilidad a la temperatura.

FluMist®

Tal como se ha mencionado anteriormente, existen numerosos ejemplos y tipos de vacuna contra la gripe. Una vacuna contra la gripe a modo de ejemplo es FluMist que es una vacuna viva atenuada que protege a niños y adultos de la enfermedad gripal (Belshe *et al.* (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children N. Engl. J. Med. 338: 1405-12; Nichol *et al.* (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial JAMA 282: 137-44). En realizaciones habituales, los métodos y composiciones de la invención actual se adaptan preferentemente a, o se usan con, la producción de la vacuna FluMist. Sin embargo, los expertos en la materia observarán que las etapas/composiciones del presente documento también se pueden adaptar a la producción de vacunas virales similares o incluso diferentes y a sus composiciones.

Las cepas de la vacuna FluMist™ contienen, por ejemplo, segmentos de genes HA y NA derivados de las cepas de tipo silvestre a las que se dirige la vacuna junto con seis segmentos de genes, PB1, PB2, PA, NP, M y NS, a partir de un virus donante maestro común (MDV). El MDV para las cepas de gripe A de FluMist (MDV-A), se creó mediante paso en serie de la cepa A/Ann Arbor/6/60 (A/AA/6/60) de tipo silvestre en cultivo primario de tejido de riñón de pollo a temperaturas sucesivamente inferiores (Maassab (1967) Adaptation and growth characteristics of influenza virus at 25 degrees C Nature 213: 612-4). El MDV-A se replica de forma eficaz a 25 °C (*ca.*, adaptado al frío), pero su crecimiento se restringe a 38 y 39 °C (*ts*, sensible a la temperatura). Además, esta dosis de virus no se replica en los pulmones de hurones infectados (*at*, atenuación). Se cree que el fenotipo *ts* contribuye a la atenuación de la vacuna

en seres humanos restringiendo su replicación en todo menos en las regiones más frías del tracto respiratorio. La estabilidad de esta propiedad se ha demostrado en modelos animales y estudios clínicos. En contraste con el fenotipo *ts* de cepas de gripe creadas por mutagénesis química, la propiedad *ts* de dosis de MDV-A no se revierte después del paso a través de hámsters infectados o aislados separados de niños (para una revisión reciente, véase Murphy & Coelingh (2002) Principles underlying the development and use of live attenuated cold-adapted influenza A and B virus vaccines *Viral Immunol.* 15: 295-323).

Los estudios clínicos en más de 20.000 adultos y niños que implican 12 cepas recombinantes 6:2 separadas han demostrado que estas vacunas están atenuadas, son seguras y eficaces (Belshe *et al.* (1998) The efficacy of live attenuated, cold-adapted, trivalent, intranasal influenza virus vaccine in children *N. Engl. J. Med.* 338: 1405-12; Boyce *et al.* (2000) Safety and immunogenicity of adjuvanted and unadjuvanted subunit influenza vaccines administered intranasally to healthy adults *Vaccine* 19: 217-26; Edwards *et al.* (1994) A randomized controlled trial of cold adapted and inactivated vaccines for the prevention of influenza A disease *J. Infect. Dis.* 169: 68-76; Nichol *et al.* (1999) Effectiveness of live, attenuated intranasal influenza virus vaccine in healthy, working adults: a randomized controlled trial *JAMA* 282: 137-44). Los recombinantes que llevan los seis genes internos de MDV-A y los dos segmentos de los genes HA y NA de un virus de tipo silvestre (es decir, un recombinante 6:2) mantienen de forma coherente los fenotipos *ca*, *ts* y *att* (Maassab *et al.* (1982) Evaluation of a cold-recombinant influenza virus vaccine in ferrets *J. Infect. Dis.* 146: 780-900). Sin embargo, la producción de tales virus recombinados usando cepas de gripe B es más difícil.

El trabajo reciente, véase, *por ejemplo*, la solicitud de patente de Estados Unidos N° 60/375.675 presentada el 26 de abril de 2002, documento de patente PCT/US03/12728 presentado el 25 de abril de 2003 y el documento de patente USSN 10/423.828 presentado el 25 de abril de 2003, documento de patente PCT/US05/017734 presentado el 20 de mayo de 2005 ha mostrado un sistema de ocho plásmidos para la generación de virus de la gripe B totalmente a partir de ADNc clonado, y métodos para la producción de virus de gripe A y B atenuados vivos adecuados para formulaciones de vacuna, tales como formulaciones de vacuna de virus vivos útiles para administración intranasal.

El sistema y métodos que se han descrito anteriormente son útiles para producción rápida en cultivo celular de dichos de la gripe A y B recombinantes y de reordenación, incluyendo virus adecuados para uso como vacunas, que incluyen vacunas atenuadas vivas, tales como vacunas adecuadas para administración intranasal tales como FluMist®. Los métodos de la presente invención en el presente documento, se usa nacionalmente en conjunto con o en combinación con dicho trabajo previo que implica, *por ejemplo*, virus de la gripe recombinados para producción de vacunas para producir virus para vacunas de una forma más estable, coherente y productiva.

Cultivo Celular

Tal como se ha indicado anteriormente, se puede cultivar virus de la gripe opcionalmente en cultivo celular. Por lo general, la propagación del virus se consigue en las composiciones de medios en las que habitualmente se cultiva la célula huésped. Las células huésped adecuadas para la replicación de virus de la gripe incluyen, *por ejemplo*, células Vero, células BHK, células MDCK, células 293 y células COS, incluyendo células 293T, células COS7. Normalmente, los cocultivos que incluyen dos de las líneas celulares anteriores, *por ejemplo*, células MDCK y cualquiera de células 293T o COS se usan en una relación, *por ejemplo*, de 1:1, para mejorar la eficacia de la replicación. Por lo general, las células se cultivan en un medio de cultivo comercial convencional, tal como medio de Eagle modificado con Dulbecco complementado con suero (*por ejemplo*, suero bovino fetal al 10 %), o en medio libre de suero, con humedad controlada y concentración de CO₂ adecuada para mantener el pH tamponado neutro (*por ejemplo*, a pH entre 7,0 y 7,2). Opcionalmente, el medio contiene antibióticos para prevenir el crecimiento bacteriano, *por ejemplo*, penicilina, estreptomycin, etc., y/o nutrientes adicionales, tales como L-glutamina, piruvato sódico, aminoácidos no esenciales, suplementos adicionales para estimular características de crecimiento favorables, *por ejemplo*, tripsina, β-mercaptoetanol, y similares.

Se ha informado extensamente de procedimientos para mantener células de mamífero en cultivo, y son bien conocidos por los expertos en la materia. se proporcionan protocolos generales, *por ejemplo*, en Freshney (1983) *Culture of Animal Cells: Manual of Basic Technique*, Alan R. Liss, Nueva York; Paul (1975) *Cell and Tissue Culture*, 5ª ed., Livingston, Edinburg; Adams (1980) *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology-Cell Culture for Biochemists*, Work and Burdon (eds.) Elsevier, Amsterdam. Los detalles adicionales con respecto a procedimientos de cultivo tisular de interés en particular en la producción de virus de la gripe *in vitro* incluyen, *por ejemplo*, Merten *et al.* (1996) Production of influenza virus in cell cultures for vaccine preparation in Cohen y Shafferman (eds.) *Novel Strategies in Design and Production of Vaccines*, que se incorpora en el presente documento en su totalidad para todos los fines. Además, variaciones en tales procedimientos adaptados a la presente invención se determina fácilmente a través de experimentación de rutina y serán familiares para los expertos en la materia.

En una realización específica de la invención, las células huésped de la invención se cultivan y/o infectan en condiciones libres de suero, en presencia o ausencia de tripsina, y se cultivan y/o infectan a temperaturas que varían de 30 grados Celsius a 39 grados Celsius; o 30 grados Celsius, o 31 grados Celsius, 32 grados Celsius, 33 grados

Celsius, 34 grados Celsius, 35 grados Celsius, 36 grados Celsius, 37 grados Celsius, 38 grados Celsius, o 39 grados Celsius.

Las células para producción de virus de la gripe se pueden cultivar en medio que contiene suero o libre de suero. En algunos casos, por ejemplo, para la preparación de virus purificados, por lo general se desea el cultivo de células huésped en condiciones libres de suero. Las células se puede cultivar a pequeña escala, *por ejemplo*, menos de 25 ml de medio, tubos o matraces de cultivo o en matraces grandes con agitación, en botellas giratorias, o en perlas de microvehículo (*por ejemplo*, perlas de microvehículo de DEAE-Dextrano, tales como Dormacell, Pfeifer y Langen; Superbead, Flow Laboratories; perlas de copolímero de estireno-tri-metilamina, tales como Hillex, SoloHill, Ann Arbor) en matraces, frascos o cultivos de reactor. Las perlas de microvehículo son pequeñas esferas (en el intervalo de 100-200 micrómetros de diámetro) que proporcionan un área de superficie grande para crecimiento celular adherente por volumen de cultivo celular. Por ejemplo un solo litro de medio puede incluir más de 20 millones de perlas de microvehículo proporcionando un tamaño superior a 8000 centímetros cuadrados de superficie de crecimiento. Para la producción comercial de virus, *por ejemplo*, para producción de vacunas, a menudo se desea el cultivo de las células en un biorreactor o fermentador. Los biorreactores están disponibles en volúmenes desde 1 dicho hasta superiores a 100 litros, *por ejemplo*, Biorreactor Cyto3 (Osmonics, Minnetonka, MN); biorreactores NBS (New Brunswick Scientific, Edison, N.J.); biorreactores a escala de laboratorio y comercial de B. Braun Biotech International (B. Braun Biotech, Melsungen, Alemania).

Independientemente del volumen de cultivo, en muchos aspectos desiertos de la presente invención, es importante que los cultivos se mantengan a una temperatura apropiada, para asegurar la recuperación eficaz de virus de la gripe recombinantes y/o reagrupados usando sistemas de múltiples plásmidos dependientes de la temperatura (véase, *por ejemplo*, Sistema de Múltiples Plásmidos para la Producción de Virus de la Gripe, mencionado anteriormente), calentamiento de soluciones de virus para filtración, etc. Por lo general, se usa un regulador, *por ejemplo*, un termostato, u otro dispositivo para detectar y mantener la temperatura del sistema de cultivo celular y/o otra solución, para asegurar la temperatura está en el nivel correcto durante el periodo apropiado (*por ejemplo*, replicación de virus, etc.).

En algunos métodos (*por ejemplo*, en los que los virus recombinados se van a producir a partir de segmentos en vectores) se introducen vectores que comprenden segmentos de genoma de gripe (*por ejemplo*, se transfectan) en células huésped de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica para introducir ácidos nucleicos heterólogos en células eucariotas, que incluyen, *por ejemplo*, coprecipitación con fosfato cálcico, electroporación, microinyección, lipofección, y transcripción usando reactivos de transfección de poliamina. Por ejemplo, se pueden transfectar vectores, *por ejemplo*, plásmidos, en células huésped, tales como células COS, células 293T o combinaciones de células COS o 293T y células MDCK, usando el reactivo de transfección de poliamina TransIT-LT1 (Mirus) de acuerdo con las instrucciones del fabricante para producir virus recombinados, etc. Aproximadamente 1 µg de cada vector a introducir en la población de células huésped con aproximadamente 2 µl de TransIT-LT1 diluido en 160 µl de medio, preferentemente medio libre de suero, en un volumen total de 200 µl. Las mezclas de ADN:reactivo de transfección se incuban a temperatura ambiente durante 45 minutos seguido de la adición de 800 µl de medio. La mezcla de transfección se añade a las células huésped, y las células se cultivan tal como se ha descrito anteriormente o a través de otros métodos bien conocidos por los expertos en la materia. Por consiguiente, para la producción de virus recombinantes o de reordenación en cultivo celular, se mezclan vectores que incorporan cada uno de los 8 segmentos del genoma, (PB2, PB1, PA, NP, M, NS, HA y NA) con aproximadamente 20 µl de TransIT-LT1 y se transfectan en células huésped. Opcionalmente, el medio que contiene suero se sustituye antes de la transfección con medio libre de suero, *por ejemplo*, OptiMEM I, y se incuba durante 4-6 horas.

Como alternativa, se puede usar electroporación para introducir tales vectores que incorporan segmentos del genoma de gripe en células huésped. Por ejemplo, se introducen de forma favorable vectores plásmidos que incorporan un virus de la gripe A o en la gripe B en células Vero usando electroporación de acuerdo con el siguiente procedimiento. En resumen, aproximadamente 5×10^6 células Vero, *por ejemplo*, cultivadas en Medio de Eagle Modificado (MEM) complementado con Suero Bovino Fetal al 10 % (FBS) se resuspenden en 0,4 ml de OptiMEM y se colocan en una cubeta de electroporación. Se añaden veinte microgramos de ADN en un volumen de hasta 25 µl a las células en la cubeta, que a continuación se mezclan suavemente dando golpecitos. La electroporación se realiza de acuerdo con las instrucciones del fabricante (*por ejemplo*, BioRad Gene Pulser II con Capacitance Extender Plus conectado) a 300 voltios, 950 microFaradios con un tiempo constante entre 28-33 mseg. Las células se vuelven a mezclar dando golpecitos suavemente y, aproximadamente 1-2 minutos después de la electroporación, se añaden 0,7 ml de MEM con FBS al 10 % directamente a la cubierta. A continuación, las células se transfieren a dos pocillos de un disco de cultivo tisular de 6 pocillos que contiene 2 ml de MEM, FBS al 10 %. La cubeta se lava para recuperar cualquier célula restante y la suspensión de lavado se divide entre los dos pocillos. El volumen final es de aproximadamente 3,5 ml. Las células se incuban a continuación en condiciones que permiten el crecimiento viral, *por ejemplo*, a aproximadamente 33 °C para cepas adaptadas al frío. Véase, *por ejemplo*, documento de patente US20050158342, que se incorpora por referencia en el presente documento.

Kits

Para facilitar el uso de los métodos y composiciones de la invención, cualquiera de los componentes y/o composiciones de vacuna, *por ejemplo*, virus en diversas formulaciones, etc., y componentes adicionales, tales

como, tampón, células, medio de cultivo, útiles para envasado e infección de virus de la gripe para fines de vacuna experimental o terapéutica, se pueden envasar en forma de un kit. Por lo general, el kit contiene, además de los componentes anteriores, materiales adicionales que pueden incluir, *por ejemplo*, instrucciones para realizar los métodos de la invención, material de envasado, y un recipiente.

5

Ejemplo 1

Desarrollo de FluMist Líquido

10 Un total de 19 lotes en masa monovalente de virus se inició bajo protocolo, incluyendo cuatro lotes de desarrollo (CB0006H, CB0008H, CG0017H, CB0018H y CB0019H). Los lotes CB0018H y CB0019H se desarrollaron para proporcionar material para diversos estudios y no se analizan adicionalmente en la presente solicitud. Se combinaron dos lotes (CB00180H y CB0012H) después de la etapa de ultracentrifugación para producir CB0020H en masa monovalente de A/Sydney. Cada lote se inició con aproximadamente 2000 huevos.

15

La manipulación de huevo y las condiciones de incubación se ajustaron del mismo modo a las del proceso usado para la producción de FluMist congelado, sin embargo, se usaron inoculación y cosecha manual debido a la escala pequeña, etc. El proceso de ultracentrifuga se redujo a un equipo más pequeño fabricado por el mismo fabricante (Discovery 90, fabricado por Hitachi y comercializado por Sorvall/heraus), con un rotor de Modelo P32CT con aproximadamente 470 ml de capacidad total. La cosecha de virus estabilizados, clarificados se cargó sobre un gradiente de sacarosa de un 20 % a un 60 %, en bandas durante una hora a 32.000 rpm, y se diluyó en fracciones de 20 ml. Las fracciones que contienen niveles máximos de HA se combinaron, se diluyeron hasta una concentración de sacarosa 0,2 M, se filtraron a través de un filtro de 0,2 micrómetros, y a continuación se transfirieron en bolsas de polímero flexible de 250 ml (Stedim) que se congelaron y se mantuvieron a temperatura inferior a -60 °C para la preparación adicional.

20

Después de una corta serie de realizaciones del ensayo, comenzó la preparación de cGMP para apoyar el ensayo clínico adicional de FluMist líquido. De nuevo se prepararon A/Beijing/262/95 (H1N1) y A/Sydney/05/97 (H3N2), y la cepa B se cambió a B/Yamanashi/166/98. Las masas monovalentes producidas se congelaron y se transportaron para mezcla, relleno, y envasado. Por supuesto, se observará aquí y en todo el documento, que el uso de cepas en particular (*por ejemplo*, Beijing, etc.) no se debería considerar necesariamente como limitante a menos que se indique específicamente de otro modo. Por lo tanto, por ejemplo, los métodos y formulaciones en el presente documento pueden usar opcionalmente diferentes cepas cada estación de gripe para producir diferentes composiciones de RTS, etc.

25

Desarrollo y Ensayos Clínicos

Se desarrolló el proceso para composiciones líquidas e incluía lotes en masa monovalentes de CAZ001-024 y CAZ035-043. El material para el ensayo clínico (CTM) incluía lotes en masa monovalentes de CAZ025-CAZ034.

30

El proceso de preparación de FluMist líquido desarrollado y usado para CTM-1 se divide en seis etapas del proceso separadas que siguen a continuación. Las etapas del proceso 1 a 5 se definieron para emparejar las etapas principales del proceso tal como se realizan usando documentos de instrucciones de preparación separadas. La etapa 6 incluye todo el proceso de mezcla y relleno. Se observará que tales etapas se pueden comparar más o menos con las etapas generalizadas que se resumen a continuación para la preparación/producción de composiciones de vacuna en general.

35

Etapas

50 Etapa 1: recepción y desinfección de huevos SPF; Etapa 2: producción de cosecha de virus; Etapa 3: concentración de virus por centrifugación zonal; Etapa 4: combinación y dilución de fracciones de pico máximo; Etapa 5: filtración y almacenamiento en masa monovalente estériles; y, Etapa 6: mezcla y relleno.

Un diagrama de flujo del proceso para la producción en masa monovalente de CTM-1 se muestra en la Figura 1. El flujo del proceso de mezcla y relleno se muestra en la Figura 2.

55

Recepción y Desinfección de huevos SPF

Los huevos embrionados libres de patógenos específicos (SPF) se adquirieron en SPAFAS, Inc. que usa programas de gestión y de vigilancia avícola diseñados para proporcionar una seguridad adecuada a los huevos libres de enfermedades. Los huevos se pusieron en Estados Unidos y se desinfectaron usando pulverizaciones de Clorwash y Quat 800. A continuación, los huevos se transportaron por vía aérea y por carretera usando un embalaje suficiente para mantener la limpieza y evitar la congelación o el sobrecalentamiento. Después de la recepción, los huevos fértiles fríos se inspeccionaron y se almacenaron en una unidad de incubación SPF a 14 °C +/- 2 °C con una humedad relativa de un 60-80 % (HR) durante un máximo de 7 días. Los huevos se transfirieron a bandejas desde las cajas proporcionadas por el vendedor y se asignó un número de lote. Los huevos se colocaron en bandejas

60

65

Jamesway de 36 huevos y las superficies de las cáscaras de los huevos desinfectados con Chlorwash y Quat 800 en un sistema de desinfección de huevos automatizado para minimizar la carga bacteriana antes de colocarlos en la incubadora. Se preparó Chlorwash a un intervalo de 43-44 °C y 48-49 °C y se preparó Quat 800 para un intervalo de 48-49 °C. Después de la desinfección, los huevos se colocaron en carros y se secaron al aire a temperatura ambiente durante un periodo no inferior a 2 horas. A continuación, los huevos se colocaron en una Incubadora Buckeye y se incubaron a 37,5 °C +/- 1 °C con una HR de un 60-80 % durante 264 horas +/- 12 horas. Después de la incubación, los huevos SPF se transfirieron desde la unidad de huevos SPF a un área de inspección visual a contraluz. Usando una lámpara de fibra óptica, se localizó la posición del saco de aire en cada huevo. Los huevos muertos o infértiles se descartaron, y los huevos fértiles se marcaron para su inoculación.

Producción de cosechas de virus

La superficie de los huevos fértiles se desinfectó con disolventes metilados industriales al 70 % (IMS) antes de la inoculación y a continuación se transfirieron para la inoculación de la masa. En la preparación de la semilla de virus de trabajo del fabricante diluida (MWVS), las semillas de virus maestro usadas para producir la MWVS para los ensayos clínicos en fase 1 se produjeron usando el método de recombinación clásico. La MWVS se transfirió en la AVU y se prepararon diluciones en serie de la MWVS descongelada en solución salina tamponada con fosfato 0,01M, pH 7,7 dentro de una cabina de seguridad microbiológica usando una pipeta desechable estéril para cada transferencia. La inoculación se produjo bajo flujo laminar en una habitación de clase 10.000 usando una máquina de inoculación Bibby semiautomática, que penetra e inocula 36 huevos por bandeja. La titulación diana del inóculo fue log₁₀2,1 DICT₅₀ por 0,1 ml y la dilución se calculó a partir de la titulación determinada previamente de la MWVS. La preparación de cada inóculo de virus se completó en las 2 horas de la retirada del vial del congelador. Las alícuotas del inóculo se almacenaron a 5 +/- 3 °C hasta su uso. El inóculo se usó en las 8 horas de preparación.

Inoculación de huevos SPF

Cada bandeja de huevos se rellenó a mano en la máquina de inoculación automatizada Bibby. Se usó un punzón para perforar la cáscara de huevo y penetrar en un huevo hasta una profundidad ajustable establecida previamente. Las agujas de inoculación se introdujeron en el huevo y la bomba de dosificación administró 0,1 ml del inóculo de MWVS en cada grupo tras lo que se retiró el punzón. Después de la inoculación, un operario retiró la bandeja de huevos y el proceso se repitió con una nueva bandeja de huevos. Los huevos inoculados con CAIV se incubaron a 33 +/- 1 °C durante un periodo de tiempo determinado por la curva de crecimiento de la cepa de virus. Después de la incubación, los huevos embrionados SPF se enfriaron a 28 °C durante 18 +/- 6 horas. Al final de la refrigeración, los huevos se transfirieron para la etapa de cosecha.

Concentración de Virus por Centrifugación Zonal

Cosecha de virus (VH)

Los huevos se cosecharon con una máquina de cosecha automática (Bibby). Las bandejas se rellenaron a mano a una estación de decapitación en la que se retiró la sección superior de la cáscara del huevo para crear un agujero de acceso para entrada de la aguja de cosecha. Los huevos se inspeccionaron visualmente antes de la cosecha y los huevos no adecuados (*por ejemplo*, decolorados) se rechazaron. Los huevos aceptables avanzaron a una estación de cosecha, en la que se retiró el fluido alantoico usando agujas y succión proporcionada por un sistema de vacío. La cosecha se recogió mezclada en recipiente de acero inoxidable con camisa de 100 l con una temperatura de la camisa de 2-8 °C. Se recogieron muestras de la cosecha del virus a partir de la combinación de VH y se sometieron a ensayo para: potencia (DICT₅₀), seguridad, leucosis aviar, *M. tuberculosis*, micoplasma, virus extraño, identidad, ensayo de transcriptasa inversa, genotipo de virus, fenotipo de virus, y atenuación.

Estabilización y clarificación

La cosecha de virus combinada (VH) se estabilizó inmediatamente a 2-8 °C hasta una concentración final de sacarosa 0,2 M, fosfato 0,01 M, glutamato 0,005M (SPG), con 10X de SPG (9 partes de VH a 1 parte de 10X de SPG). Se recogieron muestras para potencia y carga bacteriana antes de la clarificación. La cosecha de virus estabilizada se clarificó por filtración de profundidad de 5 µm para retirar partículas antes de la purificación mediante centrifugación de flujo continuo a alta velocidad. Se tomó muestra de cosecha de virus clarificado para potencia.

Centrifugación zonal, recogida, y ensayo de HA de fracciones de pico máximo

Antes de su uso, el rotor de la centrífuga se desinfectó con una dilución a 1:20 de solución concentrada de formaldehído. La VH clarificada se cargó sobre un gradiente de sacarosa (sacarosa al 10-60 % en tampón de fosfato, pH 7,2) para centrifugación a alta velocidad continua usando una centrífuga zonal CP40Y de Hitachi. El gradiente se formó por adición a la centrífuga de una solución de sacarosa al 60 % seguido de una solución de sacarosa al 10 % en tampón de fosfato. La velocidad de la centrífuga se ajustó a 4.000 rpm durante 20 minutos para permitir que las soluciones de sacarosa formaran un gradiente de densidad. La temperatura de la centrífuga se ajustó a 2-8 °C durante la formación del gradiente. Después de la formación del gradiente, comenzó el flujo del

tampón y la velocidad del rotor aumentó a 40.000 rpm, antes de cargar la VH clarificada sobre el gradiente a una tasa de 20 l por hora a 40.000 rpm. Para un lote habitual de CTM-1 con 10.000 huevos cosechados y 6 ml/huevo, la duración de la etapa de carga fue de aproximadamente tres horas. Después de la carga de la VH clarificada, la centrifugación continuó a 40.000 rpm durante un periodo adicional de una hora para permitir que el virus hiciera bandas. Las partículas de virus migraron a la porción de sacarosa al 38-45 % del gradiente y se concentraron en una "banda". Al final de esta etapa, el centrifugado disminuyó gradualmente y a continuación se detuvo para permitir la recogida de los máximos de virus. Se recogieron fracciones de 100 ml en flujo laminar en botellas de policarbonato estériles de 125 ml. Las fracciones se mantuvieron a 2-8 °C durante aproximadamente 1 hora mientras que las fracciones se sometieron a ensayo para actividad de HA. Las fracciones de pico máximo se encontraron por lo general entre un 38-45 % del gradiente de sacarosa.

Combinación y Dilución de Fracciones de Pico Máximo

Las fracciones de pico máximo en centrífuga, tal como se identifican con el ensayo de HA, se combinaron en una campana de flujo laminar vertiendo de forma aséptica las fracciones en una botella de vidrio estéril de 5 l, y se mezclaron con vórtice. El índice de refracción (IR) se leyó para determinar la concentración de sacarosa y la muestra del grupo para potencia. La combinación de la fracción del pico máximo de centrífuga (CP) se diluyó añadiendo de forma aséptica un volumen calculado de tampón de fosfato-glutamato frío estéril (2-8 °C), pH 7,2 (tampón de PBG) hasta una concentración final de sacarosa 0,2 M, fosfato 0,1 M, y glutamato 0,005 M. Por lo general esto era una dilución a 1:6. Se tomó muestra de la combinación de la fracción de pico máximo de centrífuga diluida (DCP) para potencia y carga bacteriana.

Filtración estéril y Almacenamiento de Masa Monovalente

La DCP se bombeó a través de un tubo estéril hasta una habitación de llenado de Clase 100 para filtración estéril. La DCP se filtró estéril con un filtro de 0,22 µm en una botella de vidrio de 5 l estéril en una campana de Flujo de Aire Laminar. La masa monovalente filtrada se mezcló y se tomaron muestras para ensayo de potencia, identidad, y esterilidad. El filtro de 0,22 µm se sometió a ensayo íntegramente antes y después del proceso de filtración. A continuación se tomó alícuota de MB en botellas de policarbonato de un litro estériles. La MB se recogió en alícuotas de 500 ml con un volumen total de tres a cuatro litros. Las botellas de PC de un litro estériles se almacenaron a -60 °C o temperatura inferior. La titulación del virus en masa se determinó mediante ensayo de DICT₅₀. La masa monovalente se transportó a continuación a ≤ -60 °C para mezcla y ensayo.

Mezcla y Llenado

Las etapas principales para el proceso de mezcla y llenado de la preparación de la mezcla trivalente en masa fueron: Descongelación, Preparación de Diluyente, Mezcla, Llenado, y Envasado.

Descongelado y Mezcla

Las botellas apropiadas de 1 l de masa monovalente se retiraron del almacenamiento congelado (≤ -60 °C para MB) y se transfirieron a una habitación de descongelado. Las cantidades necesarias de las tres masas monovalentes individuales y diluyente de SPG se calcularon en base a la titulación de capacidad infección de la masa y la resistencia de la formulación necesaria. Las botellas de MB se cargaron en un baño de agua a 33 ± 3 °C y se agitaron manualmente cada cinco minutos. La descongelación se controló visualmente para asegurar que todas las botellas se descongelaban antes de dejar el baño de agua, y que todas las botellas es congeladas se retiraban cada 15 minutos. Una vez descongeladas, las botellas de MB se trasladaron a un refrigerador a 5 ± 3 °C y se mantuvieron hasta que se habían descongelado todas las botellas necesarias.

El diluyente de sacarosa fosfato glutamato estéril (SPG) se preparó en BioWhittaker (Walkersville, MD). Justo antes de la preparación de la mezcla de FluMist líquido, se añadió aproximadamente un tercio de la cantidad de diluyente de SPG necesario para la mezcla a una botella estéril de 2 l. La botella se calentó a temperatura ambiente, a continuación añadió gelatina porcina hidrolizada (polvo) en la cantidad necesaria para alcanzar un nivel de 10 mg/ml en la mezcla final. El diluyente de SPG se pasó a continuación a través del filtro (lavando a través de cualquier gelatina residual) para alcanzar el volumen diana especificado en el cálculo de la mezcla y se almacenó a 5 ± 3 °C hasta su uso.

Las botellas descongeladas se trasladaron a una habitación de mezcla y los virus se transfirieron de forma aséptica a un recipiente de proceso de vidrio de 5 l. El recipiente se mantuvo a 5 ± 3 °C a través de todo el proceso de mezcla y el proceso de llenado posterior usando embalajes fríos refrigerados. El diluyente de SPG - gelatina se añadió después de haber añadido las tres cepas de virus, y, si fuera necesario, el pH se ajustó con HCl a 7,2 ± 0,3. Las tres cepas de virus y diluyente se mezclaron por mezcla continua con una barra de agitación magnética y placa de agitación.

Llenado y Envasado

Después del ajuste del pH, el recipiente de mezcla trivalente de masa se trasladó a una habitación de llenado y se conectó a un aparato de llenado INOVA. La máquina de llenado INOVA relleno un volumen de producto ajustado previamente en una fila de ocho pulverizadores desechables BD HYPAK y a continuación se taponaron los pulverizadores. Las operaciones de llenado y taponado del pulverizador y verificaciones de comprobación de peso

continuarán según lo indicado. Una nueva bañera de pulverizadores se colocó manualmente en las estaciones de alimentación después de la finalización de cada ciclo de llenado y la bañera de pulverizadores llenos se retiró de la estación de descarga. El recipiente de mezcla se mantuvo a 5 ± 3 °C con embalajes fríos durante el proceso de llenado.

Después del llamado de los pulverizadores nasales, las vacunas trivalentes rellenas se cargaron en bañeras y se transportaron inmediatamente mediante carretilla a una zona de envasado para envasado y marcado final. Los pulverizadores envasados y marcados se almacenaron a 5 ± 3 °C.

Optimización de Parámetros de Funcionamiento Corriente Arriba

Clarificación de Cosecha por Filtración (5 µm)

Filtración frente a Centrifugación a Velocidad Baja: Las pérdidas de potencia de clarificación usando la centrifugación a velocidad baja convencional para FluMist congelado por lo general se estiman de 0,2 a 0,3 log₁₀ DICT₅₀/ml. Una pérdida de centrifugación estimada para dos cepas fue: la pérdida de titulación fue insignificante para una cepa y 0,3 logs (rendimiento de la etapa de un 59 %) para una segunda cepa usando las condiciones convencionales de 3400 g durante 20 minutos. Cuando se usó un filtro de profundidad de 5 micrómetros como una alternativa a la centrifugación durante las realizaciones del desarrollo pre-CTM, el rendimiento medio de la etapa de clarificación se estimó a un 41 %. Cuando se recogió la variabilidad del ensayo de DICT₅₀ en consideración, se concluyó que cualquier método de clarificación proporcionaba mejores resultados que la adición después de la clarificación. La filtración se eligió como el método de clarificación en base a la facilidad de funcionamiento y aumento de la escala.

Comparación de Tamaños de Poro de Filtro de Profundidad: Se usaron lotes de desarrollo CAZ015 - CAZ017 más los diez lotes de CAZ025 a CAZ034 de CTM-1 para estimar las pérdidas de filtración de profundidad usando el proceso de CTM-1. A/Beijing, A/Sydney, y B/Harbin presentan rendimientos de la etapa de clarificación de un 147 %, un 78 %, y un 73 % respectivamente para la etapa de clarificación de 5 µm.

El filtro de 5 µm (Profile II de Pall) se comparó con un filtro de profundidad de 20 µm (Profile Star de Pall), que se usó para los lotes CAZ035 (A/Sydney), CAZ036 (A/Beijing) y CAZ037 (B/Harbin). A/Beijing, A/Sydney, y B/Harbin presentaban rendimientos de la etapa de clarificación de un 65 %, un 35 %, y un 209% respectivamente para la etapa de clarificación de 20 µm. Estos rendimientos eran comparables con resultados de clarificación de 5 µm, sin embargo un cambio del proceso al filtro de 20 µm no se recomendaba para todas las realizaciones debido a la contaminación significativa de las cosechas clarificadas con glóbulos rojos tamaño de poro más grande.

Optimización de Parámetros de Funcionamiento Corriente Abajo:

Escala de Centrifuga

Se realizaron estudios de carga de centrifuga y temperatura usando la centrifuga CP40Y a gran escala y el rotor de flujo continuo RP40CT de Tipo D; éstos compararon diversos tamaños de lote de huevos y puntos de ajustes de temperatura de centrifuga (véase la Figura 3). CAZ015 (B/Harbin), CAZ018 (A/Sydney), CAZ020 (A/Beijing) y CAZ022 (A/Sydney) presentaban tamaños de lote de 10K huevos y una temperatura de ajuste de centrifuga de 4 °C. CAZ 016 (B/Harbin), CAZ019 (A/Sydney), y CAZ021 (A/Beijing) presentaban tamaños de lotes de 20K huevos y una temperatura de ajuste de centrifuga de 14 °C. Se usó un caudal de carga de 20 l/h para todos estos estudios. El porcentaje de recuperación en la combinación de fracción de pico máximo diluida (rendimiento de la etapa) en la titulación de la cosecha clarificada en la figura. Tal como se puede observar, los lotes con 10K lotes de huevos presentaban un intervalo de recuperación de un 40 – 184 % mientras que los lotes de 20K huevos variaban en un 40-55 %. La recuperación media para el tamaño del lote de 10K era de un 113 % y las recuperaciones del lote de 20K huevos presentaban un promedio de 46 %. Se seleccionó un tamaño de lote de 10.000 huevos por realización para la preparación de CTM como un límite conservativo en esta etapa del proceso de desarrollo.

Temperatura

Las realizaciones de desarrollo de CAZ015 a CAZ022 se realizaron usando punto de temperatura ajustado para rotor de ultracentrifuga ajustado a 4 °C o 14 °C. Con una excepción, las realizaciones del desarrollo a 14 °C también se realizaron a una escala mayor que la habitual (20.000 huevos por lote). En general estos lotes presentaban recuperaciones menores de virus vivo, sin embargo esto se podría deber a la carga de centrifuga en lugar de a los efectos de temperatura. En vista de los resultados mejores a 4 °C y la posibilidad de aumento de las tasas de crecimiento microbiano a temperaturas más elevadas, se seleccionó una temperatura de 4 °C como el punto de temperatura usado para ultracentrifuga en este punto en el desarrollo del proceso.

Ensayo Clínico 1 (CTM-1)

5 Se produjeron los lotes de virus monovalente para CTM-1 y se incluyeron lotes de masa monovalente de CAZ025 a CAZ034. Los resultados del ensayo de QC en proceso para los lotes de masa monovalente de CTM-1 se presentan en la Figura 3 y en el presente documento. Los rendimientos medios de la etapa por cepa se presentan en la Figura 3 y en el presente documento. Los resultados se resumen a continuación.

10 *Potencia:* Las potencias (\log_{10} DICT_{50 ml}) de lotes de cosecha de virus B/Harbin y A/Beijing eran superiores o iguales a 8.1. A/Sydney variaba de 7,5 a 8.8 excepto para CAZ030, que mostraba una titulación muy baja (6,0) debido a la contaminación de la yema en la cosecha. La titulación de la masa monovalente para A/Beijing era 9,3 o superior, para B/Harbin la titulación variaba de 8,4 a 9,85 y para A/Sydney variaba de 7,9 a 8,6 (excluyendo CAZ030). Para CAZ030 la titulación era inferior a la del nivel aceptable para la mezcla tal como se analiza a continuación.

15 *Rendimiento del Proceso:* Se hace referencia a los rendimientos del proceso para cada lote en las Figuras y se analizan adicionalmente en el presente documento. Los rendimientos del proceso no se corrigieron para pérdidas de muestreo. A/Beijing presentaba un rendimiento medio del proceso global de un 16 % (163 dosis/huevo), A/Sydney presentaba un rendimiento medio de un 13 % (6 dosis/huevo), y B/Harbin presenta un rendimiento medio de un 93 % (86 dosis/huevo). Véanse las figuras. Las estimaciones de rendimiento errático reflejan variabilidad del ensayo así como el rendimiento real del proceso. En particular, los resultados de B/Harbin estaban sesgados hacia arriba con una estimación muy elevada de la titulación de masa monovalente del Lote CAZ028 (dando como resultado un rendimiento del proceso estimado de un 252 % y 246 dosis/huevo). La titulación de la combinación de pico máximo diluida en este caso se determinó a 0,95 logs más elevada que la combinación de pico máximo de centrifuga, aunque se esperaría una disminución debido a la dilución. De forma análoga la titulación de masa monovalente filtrada era más elevada que la del material filtrado previamente, que se puede explicar mediante el ensayo de variabilidad. Los otros dos lotes de B/Harbin, (CAZ026 y CAZ027) presentaron rendimientos del proceso de un 20 % y un 8 % respectivamente, y un rendimiento del huevo de 7 dosis/huevo para ambos lotes. Las mezclas trivalentes que incluían el lote de masa CAZ028 (CBF1004 y CBF1007) dieron como resultado potencias de B/Harbin en pulverizadores de producto final que eran de 0,6 y 0,4 \log_{10} ACID₅₀ por dosis. Esto sugiere adicionalmente que la titulación de masa monovalente de CAZ028 estaba sobreestimada.

35 *Carga bacteriana y Endotoxina:* Se sometió a ensayo la carga bacteriana de cosecha de virus, cosecha estabilizada y fracciones de pico máximo de centrifuga diluidas. Los resultados del ensayo de carga bacteriana no proporcionan una representación clara de cargas de organismos a través del proceso: los resultados del ensayo en cosecha de virus y muestras de combinación de fracción de pico máximo en centrifuga diluidas consistían principalmente en "no se detecta" (ocho lecturas); o "> 100 cfu/ml" (diez lecturas) con solamente dos valores intermedios. Los valores de endotoxina para las masas monovalentes variaban de < 5 EU/ml a 587 EU/ml.

40 *Concentración de Sacarosa:* Las combinaciones de fracción de pico máximo de centrifuga presentaban concentraciones de sacarosa que variaban de un 39 a un 43,5 % (CAZ030 no se incluyó en el intervalo). Las masas monovalentes presentaban una concentración media de sacarosa de un 7,6 %.

45 Los ensayos de liberación de masa monovalente se presentan en las figuras. Todos los lotes de CTM-1 excepto CAZ030 (que no se sometió a ensayo) aprobaron los ensayos de liberación de masa.

50 *Análisis de SDS-PAGE:* Las masas monovalentes se caracterizaron adicionalmente mediante geles de SDS-PAGE al 10 % teñidos con Gel Code Azul. En base a los pesos moleculares calculados de proteína y el número de copias por partículas para cepas de gripe A y B, se esperarían que bandas de gel en la región de 50-60 kDa (proteína HA1), 56 kDa (proteína NP) y 27 kDa (proteína M1) destacaran en geles de virus de gripe purificado. También por estar presente la proteína Ha2 (de 23 a 30kD).

55 Se compararon los geles de SDS-PAGE para A/Beijing/262/95 CAZ031, y 33 y A/Sydney/05/97 CAZ029, 30, y 34. El intervalo de resolución para los geles al 10 % era nominalmente de 200-31 kDa. Debido a esta limitación, la interpretación de las bandas de proteína HA1 (23-30 kDa) y de proteína M (21-27 kDa) se debería realizar con precaución.

60 Para lotes de masa monovalente (MB) de A/Beijing y A/Sydney, se observó una banda oscura en la región esperada de la proteína NP (justamente por encima del marcador de 55 kDa) para las muestras de A/Beijing, y se observó una banda justo por encima de 116 kDa para ambas cepas. Ambas cepas contenían una banda cerca del frente del gel (inferior a 31 kD) coherente con la proteína M. La banda HA1 esperada en solamente por encima del marcador de 66 kD era menos fuerte, posiblemente debido a la heterogeneidad del peso molecular de la glicoproteína dando como resultado un patrón de bandas más dispersas. La tinción de la supuesta proteína NP1 también parece que está disminuida. Para las muestras de A/Sydney se observó una amplia diversidad de bandas, coherente con una proporción más elevada de proteína de huevo en la masa monovalente.

65

Dosis por Lote y Huevo: El cálculo de la dosis para las tres cepas se realizó en base a un volumen medio de relleno de 0,24 ml que contenía $1,2E+07$ partículas de DICT₅₀. En base al cálculo de la dosis anterior, los lotes monovalentes de A/Beijing presentaban un promedio de 1.576.022 dosis totales por lote. Las dosis medias totales por lote para B/Harbin y A/Sydney fueron 601.446 y 50.825 dosis por lote respectivamente, o un 38 % y un 3,2 % de las dosis medias totales de A/Beijing por lote respectivamente. Estos resultados se traducen en los siguientes valores para dosis monovalentes por huevo: 163 dosis/huevo para A/Beijing, 86 dosis/huevo para tipo B/Harbin y 6 dosis/huevo para A/Sydney. El cálculo de la dosis/huevo se basó en el número total de huevos cosechados para la preparación de lote.

Resumen de Rendimientos de Huevos: A/Sydney presentaba el volumen medio de cosecha más elevado por rendimiento de huevo, seguido de A/Beijing y B/Harbin. El rendimiento por huevo promediaba 5,6 ml/huevo para B/Harbin, 6,5 ml/huevo para A/Beijing, y 6,8 ml/huevo para A/Sydney. El rendimiento global de los huevos viables para la producción promediaba un 82 %. Los rendimientos de los huevos se basaban en el número total de huevos cosechados en comparación con el número total de huevos para producción. El porcentaje de rechazo de huevos antes de la inoculación promediaba un 10 %. El porcentaje de rechazo después de la incubación promediaba un 5 %, con la excepción de CAZ028, que presentaba una tasa de rechazo de un 29 %.

Resumen del Rendimiento de Purificación (DICT₅₀): Los valores de potencia de cosecha calificada eran más elevados que los del material de partida para alguno de los lotes, dando como resultado rendimientos de la etapa superiores a un 100 %. Las estimaciones del rendimiento de la etapa se ven afectadas por la variabilidad del ensayo de DICT₅₀, que presentaba una desviación estándar superior a $0,3 \log_{10}$ DICT₅₀/ml tal como se realiza en el momento de las realizaciones de la producción. Además, el rendimiento de la etapa en la etapa de Combinación de Fracción de Pico Máximo de Centrífuga Diluida varía ampliamente para las tres cepas y es superior a un 100 % para los diez lotes de CTM. Esto parece que se debe a un sesgo sistemático corriente debajo de las titulaciones para las Combinaciones de Fracción de Pico Máximo de Centrífuga (tal como se sugiere mediante el rendimiento > 100 de la siguiente etapa), y se cree que está relacionado con los niveles elevados de sacarosa en estas muestras.

Comentarios sobre los lotes de CTM-1

En las filas a realizaciones y ejemplo en el presente documento es preferente que no se produzca ninguna contaminación de la yema de los fluidos de cosecha que se podría producir, por ejemplo, con ajustes de la máquina de cosecha inadecuados.

Etapa de filtración de 0,2 micrómetros: En efecto, el registro del lote especificaba filtro desechable Kleenpak de Pall, sin embargo no se usó para ninguno de los lotes de CTM. Los lotes CAZ025 - 030 usaron un filtro de cartucho (AB1DFL7PH4 – filtro Fluorodyne II de PVDF hidrófilo de Pall) con cubierta en lugar del Kleenpak. Los filtros presentaban materiales de fabricación similares (PVDF hidrófilo), sin embargo las áreas del filtro eran de 5100 cm² para el filtro de cartucho Fluorodyne II frente a los 1500 cm² para el filtro de cartucho Kleenpak Fluorodyne II. Para los lotes CAZ031/032/033/034 se usó un ensamblaje de filtro NovaSip C3DFLP1 desechable de Pall en lugar del Kleenpak. El área de la superficie de la membrana para el filtro C3DFLP1 era la misma que para el filtro Kleenpak (1500 cm²).

Salidas de temperatura: Durante la segunda etapa de incubación para CAZ031, la temperatura alcanzó los 34,4 °C durante 13 horas y para CAZ032 la temperatura disminuyó a 31,5 °C durante 4 horas. Estos lotes alcanzaron titulaciones normales de cosecha superiores a $9,0 \log_{10}$ DICT₅₀/ml, de modo que no se contempló que las salidas tuvieran impacto en el producto.

Resumen

En base a dos Campañas de Preparación de Ensayos Clínicos (CTM-1 y CTM-2), el desarrollo del proceso y trabajo de preparación de FluMist líquido indica que el proceso es adecuado para producir suministros clínicos que aprueban las especificaciones de liberación. Los datos de agregados de ambas realizaciones de CTM y diversos estudios de desarrollo conducen a las siguientes estimaciones de rendimiento medio del proceso:

- Clarificación: rendimiento de un 50 %
- Purificación con Ultracentrífuga: rendimiento de un 50 %
- Dilución de pico máximo y filtración estéril: rendimiento de un 20 a un 50 %

Ejemplo 2 Ensayo de estabilidad

Se preparó una formulación de vacuna trivalente que comprende tres virus recombinantes diferentes de la gripe ($7,0 \pm 0,5 \log_{10}$ FFU/dosis [aproximadamente $7,0 \pm 0,5 \log_{10}$ DICT₅₀/dosis]) y que comprende sacarosa 200 mM; hidrolizado de gelatina porcina al 1 % en (p/v); monoclorhidrato de arginina al 1,21 % en (p/v) [equivalente a un 1 % en (p/v) de base de arginina]; y glutamato monosódico 5 mM en tampón de fosfato potásico 100 mM (pH 7,2). La estabilidad de la formulación se almacenó a -25,0 grados C +/- 5,0 grados durante un periodo de tiempo superior o igual a 24 horas, pero inferior o igual a dos semanas y a continuación se almacenó a 2-8 grados C durante diversos

periodos de tiempo. Se determinó que esta formulación (por ejemplo, lote 0141500003) era estable durante al menos 12 semanas a 4-8 grados C. En particular, la potencia para cada cepa de virus permaneció dentro de 0,5 \log_{10} de la potencia del comienzo antes del almacenamiento a 4-8 grados C.

5 Otros estudios han mostrado que formulaciones equivalentes (que comprenden tres virus recombinante es diferentes de la gripe (7,0 +/- 0,5 \log_{10} FFU/dosis [aproximadamente 7,0 +/- 0,5 \log_{10} DICT₅₀/dosis]) y que comprenden sacarosa 200 mM; hidrolizado de gelatina porcina al 1 % en (p/v); monoclóhidrato de arginina al 1,21 % en (p/v) [equivalente a un 1 % en (p/v) de base de arginina]; y glutamato monosódico 5 mM en tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 7,2) de diferentes lotes clínicos (por ejemplo, "Campaña 3") son estables durante
10 aproximadamente 12-15 meses a 5,0 (+/- 3,0) grados C.

Los estudios posteriores han mostrado que las formulaciones que comprenden solamente sacarosa 200 mM; hidrolizado de gelatina al 1 % en (p/v); monoclóhidrato de arginina al 1,21 % en (p/v) [equivalente a un 1 % en (p/v) de base de arginina] en tampón de fosfato potásico 100 mM, pH 7,2, pero sin glutamato, presentaban una
15 estabilidad equivalente a la de las formulaciones anteriores con glutamato.

Aunque la invención anterior se ha descrito con cierto detalle para fines de claridad y de comprensión, será evidente para los expertos en la materia a partir de la lectura de la presente divulgación que se pueden realizar diversos cambios en forma y detalle sin apartarse del alcance real de la invención. Por ejemplo, todas las técnicas y aparatos
20 que se han descrito anteriormente se pueden usar en diversas combinaciones.

REIVINDICACIONES

1. Un método para preparar una composición de virus de gripe vivo estable en refrigerador, método que comprende:
 - 5 (a) clarificar una cosecha viral que comprende virus de gripe vivos por filtración, produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada;
 - (b) someter la cosecha viral clarificada a centrifugación zonal continua, produciendo de ese modo una cosecha viral clarificada adicional;
 - 10 (c) diluir y esterilizar por filtración estéril dicha cosecha viral clarificada adicional, produciendo de ese modo una cosecha viral esterilizada; y
 - (d) combinar la cosecha viral esterilizada con un estabilizante para obtener una concentración final de sacarosa al 6-8 % en peso/volumen (p/v), arginina al 1-2 % en p/v, ácido glutámico monosódico al 0,05-0,1 % en p/v e hidrolizado de gelatina al 0,5-2 %,
 - 15 mediante lo cual se produce una composición de virus de gripe estable en refrigerador, cuya composición presenta una pérdida de potencia logarítmica inferior a 1,0 durante un periodo de 6 meses cuando se almacena de 4 °C a 8 °C.
2. El método de la reivindicación 1, en el que el virus de la gripe comprende uno o más de: un virus de la gripe adaptado al frío atenuado, un virus de la gripe adaptado al frío sensible a la temperatura, un virus de la gripe sensible a la temperatura atenuado, o un virus de la gripe sensible a la temperatura adaptado al frío atenuado.
 - 20 3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que el virus de la gripe comprende una estructura principal genética de uno o más de los siguientes virus de la gripe: A/Ann Arbor/6/60 y B/Ann Arbor/1/66.
 - 25 4. El método de la reivindicación 1, 2 o 3, en el que la cosecha viral se estabiliza a 2-8 °C mediante la adición de estabilizante antes de la clarificación en (a).
 5. El método de la reivindicación 4, en el que el estabilizante comprende sacarosa, fosfato y glutamato (SPG).
 - 30 6. El método de la reivindicación 5, en el que se añade el estabilizante de modo que se obtiene una concentración final de sacarosa 0,2 M, fosfato 0,01 M y glutamato 0,005 M.
 7. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cosecha viral se clarifica en (a) por filtración de profundidad.
 - 35 8. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cosecha viral se clarifica en (a) por filtración a través de un filtro de 5 µm.
 9. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la cosecha viral se clarifica en (a) a través de dos o más filtros.
 - 40 10. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en el que la cosecha viral se clarifica en (a) a través de un filtro que varía de 0,2 micrómetros a 1,5 micrómetros.
 - 45 11. El método de la reivindicación 10, en el que la cosecha viral se clarifica en (a) por filtración a través de un filtro que varía de 0,2 micrómetros a 0,8 micrómetros.
 12. El método de la reivindicación 10, en el que la cosecha viral se clarifica en (a) por filtración de profundidad a través de un filtro que varía de 0,2 micrómetros a 0,8 micrómetros.
 - 50 13. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la centrifugación zonal continua se realiza sobre un gradiente de densidad de sacarosa.
 14. El método de la reivindicación 13, en el que el gradiente de densidad de sacarosa es en tampón fosfato.
 - 55 15. El método de la reivindicación 13, en el que el gradiente de densidad de sacarosa es un gradiente de sacarosa al 10 %-60 % en tampón fosfato.
 16. El método de la reivindicación 14 o 15, en el que el gradiente de sacarosa en tampón fosfato es a pH 7,2.
 - 60 17. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la centrifugación zonal continua se realiza a una temperatura de aproximadamente 2 °C a aproximadamente 8 °C.
 - 65 18. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que se añade un diluyente que comprende fosfato y glutamato a la cosecha viral clarificada adicional en la parte (c).

ES 2 531 734 T3

19. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que el virus clarificado adicional se diluye hasta una concentración de sacarosa 0,2 M.
- 5 20. El método de la reivindicación 18 o 19, en el que el diluyente se añade a la cosecha viral clarificada adicional hasta una concentración final de sacarosa 0,2 M, fosfato 0,1 M y glutamato 0,005 M.
21. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que comprende adicionalmente en (d) mezclar la cosecha viral esterilizada con al menos una otra cosecha viral esterilizada, produciendo de ese modo una cosecha viral mezclada.
- 10 22. El método de la reivindicación 21, en el que la cosecha viral esterilizada se mezcla con otras dos cosechas virales esterilizadas, produciendo de ese modo una cosecha viral mezclada trivalente.
- 15 23. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la concentración final es sacarosa al 6-8 % en peso/volumen (p/v); arginina al 1-2 % en p/v; ácido glutámico monosódico al 0,05-0,1 % en p/v; hidrolizado de gelatina al 0,5-2 % en tampón fosfato 100 mM.
- 20 24. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, en el que la concentración final es sacarosa al 6,84 % en peso/volumen (p/v), arginina al 1,21 % en p/v, ácido glutámico monosódico al 0,094 % en p/v, y hidrolizado de gelatina al 1 %.
- 25 25. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la dilución se realiza antes de la esterilización en la parte (c).
26. El método de la reivindicación 1, que comprende formular la cosecha viral esterilizada, mediante la cual se produce una composición de virus de gripe adecuada para administración intranasal.
- 30 27. El método de la reivindicación 1, que comprende formular la cosecha viral esterilizada mediante la cual se produce una composición de virus de gripe adecuada para administración a un ser humano.
28. El método de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que la composición presenta una pérdida de potencia logarítmica inferior a 1,0 durante un periodo de 12 meses cuando se almacena de 4 °C a 8 °C.

Figura 1
Flujo de Proceso CTM-1

Etapas de Producción de Cosecha de Virus

Parámetros del Proceso

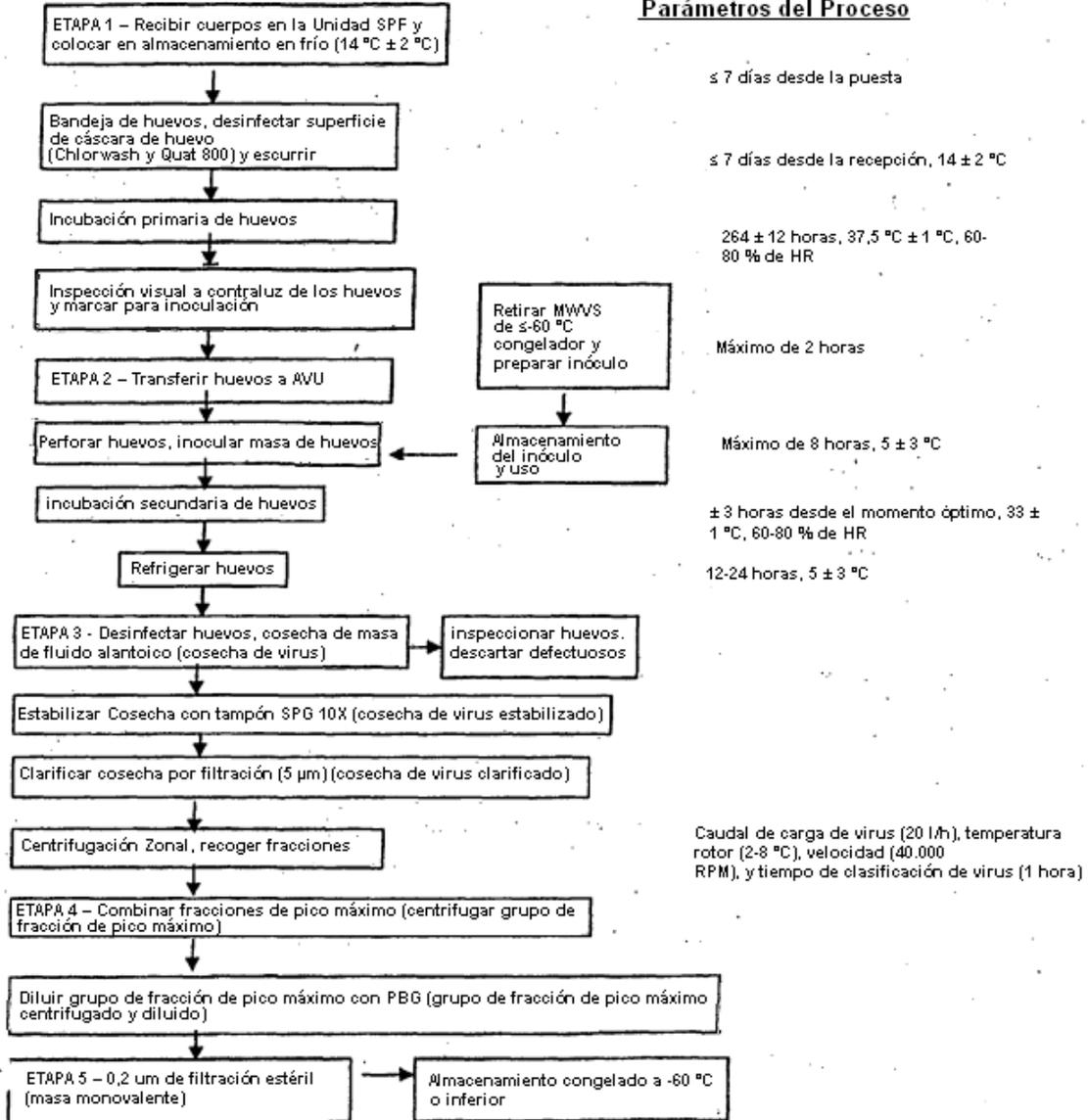
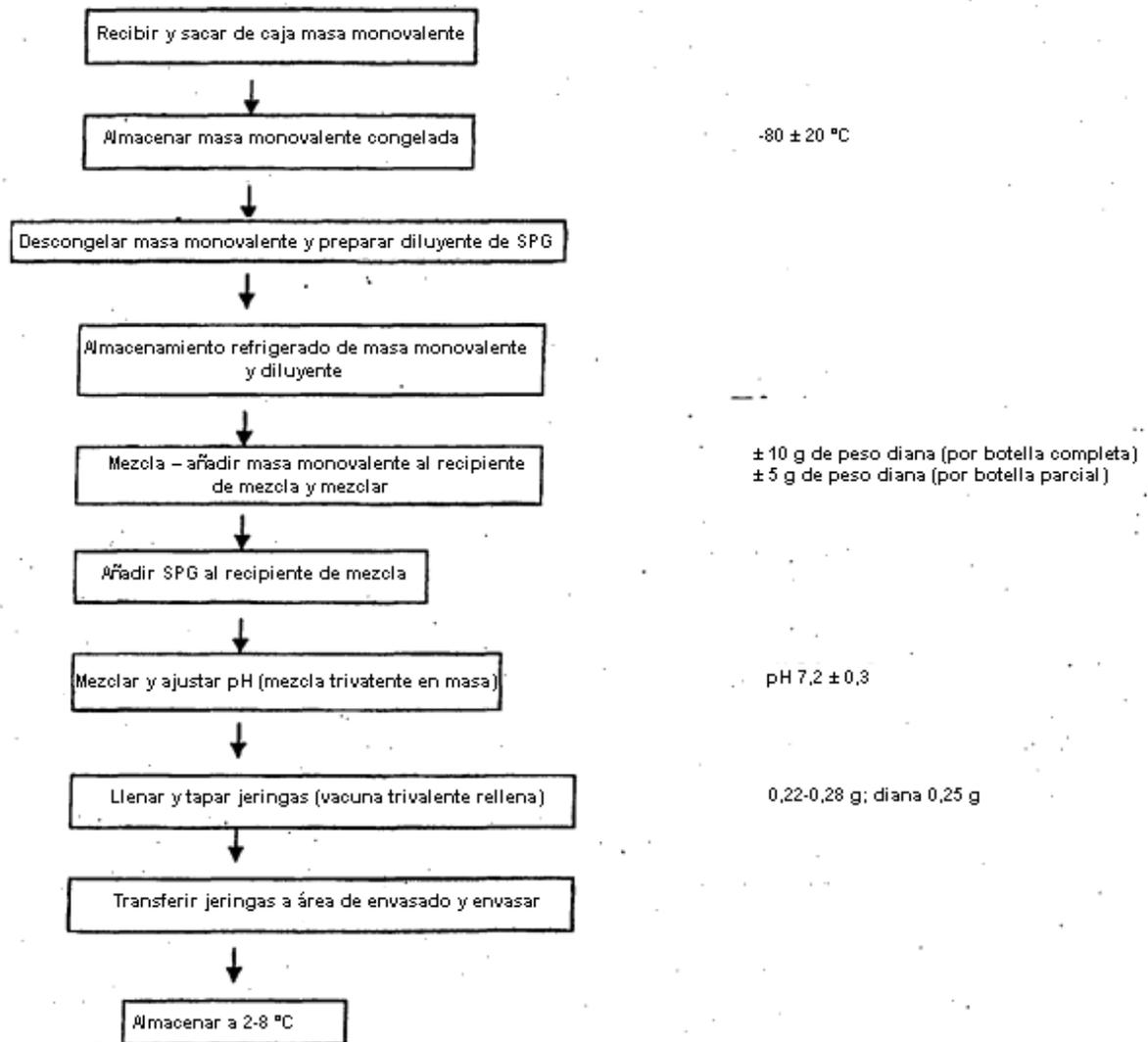


Figura 2
Flujo de Proceso CTM-1

ETAPA 6 – Etapas de Producción de Mezcla y Llenado

Parámetros del Proceso



Carga en Centrifuga y Estudios de Temperatura

Cepa	Número de Lote	Volumen VH Clar. (ml)	Titulación de VH Clar. (Logio DICT ₅₀ /ml)	Partículas Totales para Carga (VH Clar.)	DCP Vol (ml)	Titulación de DCP (Logio DICT ₅₀ /ml)	Masa Mono. (MB) (ml)	Titulación de MB (Logio DICT ₅₀ /ml)	Partículas Totales para DCP o MB	Rendimiento Etapa
Lote de 5K huevos a 14. °C de temp. de centrifuga										
B/Harbin	CAZ017	34700	7,3	6,92E+11	2200	8,0	N/A*	N/A*	2,2E+11	32
Lote de 10K huevos a 4. °C de temp. de centrifuga										
B/Harbin	CAZ 015	74500	7,1	9,38E+11	3000	8,2	N/A*	N/A*	4,75E+11	51
A/Sydney	CAZ 018	70000	7,6	2,66E+12	2106	8,7	N/A*	N/A*	1,06E+12	40
A/Beijing	CAZ 020	79000	8,6	3,15E+13	2900	10,3	N/A*	N/A*	5,79E+13	184
A/Sydney	CAZ 022	54000	8,4	1,36E+13	3004	9,9	N/A*	N/A*	2,39E+13	176
	Promedio									113
Lote de 20K huevos a 14. °C de temp. de centrifuga										
B/Harbin	CAZ 016	95500	7,7	4,79E+12	3300	8,9	N/A*	N/A*	2,62E+12	55
A/Sydney	CAZ 019	119000	7,6	4,22E+12	N/D	N/D	4200	8,6	1,67E+12	40
A/Beijing	CAZ 021	129000	8,8	8,14E+13	3600	10	N/A*	N/A*	3,60E+13	44
	Promedio									46

N/D = No Disponible

N/A* = No Aplicable

¹Datos extraídos de "Fact on Loading Studies", excepto para CAZ 015 y 022

²Datos extraídos de "Fact on Loading Studies", excepto para CAZ 018, 019, 021 y 022

TABLA 2.3.1.1 A
CTM-1

Resumen de Datos del Ensayo QC – Resultados del Ensayo En Proceso

FLUMIST
LÍQUIDO

	tipo B/Harbin/07/94						A/Sydney/05/97						A/Beijing/262/95		
	CAZ026	CAZ027	CAZ028	CAZ025	CAZ029	CAZ030	CAZ034	CAZ031	CAZ032	CAZ033	CAZ034	CAZ031	CAZ032	CAZ033	
Ensayos En Proceso															
Potencia por DICT ₅₀ (log ₁₀ ml ⁻¹)****															
• Cosecha del Virus (Sin estabilizar)	8,1	8,25	8,65	8,8	7,5	6,0	7,6	9,25	8,3	8,85					
• Cosecha del Virus Estabilizada	7,8	8,2	8,3	7,85	7,7	7,1	7,55	9,2	9,35	9,2					
• Cosecha del Virus Clarificada	7,7	7,8	8,75	8,1	7,4	6,8	7,35	8,9	8,65	8,8					
• Flujo Continuo (Supernate Zonal)	7,15	8,3	7,65	7,2	6,7	6,1	7,15	8,6	8,35	8,55					
• Centrifugar Combinación Fracción de Pico Máximo	9,0	9,25	8,7	8,8	9,45	8,7	9,2	10,4	> 10,2	10,5					
• Centrifugar Diluido Combinación Fracción de Pico Máximo	8,55	8,5	9,65	8,55	8,7	8,9	8,75	10,2	10,1	9,75					
• Masa Monovalente (Concentrar Zonal Filtrado Estéril)	8,35	8,4	9,85	8,55	8,35	*5,9	7,9	10,0	9,75	9,3					
Carga bacteriana (cfu/ml)															
• Cosecha del Virus (Sin estabilizar)	80	> 100	< 1	< 1	> 100	> 100	> 100	> 100	< 1	> 100					
• Cosecha del Virus Estabilizada	15	> 100	< 1	< 1	> 100	> 100	> 100	> 100	< 1	> 100					
• Centrifugar Diluido Combinación Fracción de Pico Máximo	23	> 100	< 1	< 1	< 1	< 1	> 100	< 1	> 100	> 100					
Endotoxina (Eu/ml)															
• Masa Monovalente (Concentrar Zonal Filtrado Estéril)	135,8	586,9	**258,9	52,84	36,27	263,2	< 5	11,43	21,67	25,39					
Concentración de Sacarosa (%)															
• Centrifugar Combinación Fracción de Pico Máximo	42,05	40,65	39,85	40,6	39,1	31,6	40,4	40,65	43,45	412					
• Masa Monovalente (Concentrar Zonal Filtrado Estéril)	7,5	7,5	7,6	7,5	7,5	7,4	7,7	7,9	7,5	8,1					

*CAZ030 no se aceptó para el procesamiento adicional debido a la baja titulación ** Muestra de endotoxina de la Etapa de Cosecha Promedio de valores informados de QC

TABLA 2.3.1.1 B
CTM-1
Rendimientos medios para A/Beijing, A/Sydney, B/Harbin

FLUMIST
LIQUIDO

Etapa del proceso	Cepa							
	A/Beijing ¹		A/Sydney ²		B/Harbin ³			
	% Rendimiento Etapa	% Rendimiento Global	% Rendimiento Etapa	% Rendimiento Global	% Rendimiento Etapa	% Rendimiento Global		
Cosecha del Virus Estabilizada	N/A	100	N/A	100	N/A	100		
Cosecha del Virus Clarificada	147	147	78	78	125	125		
Centrifugar Combinación Fracción de Pico Máximo	19	10	60	30	14	8		
Centrifugar Diluido Combinación Fracción de Pico Máximo	391	35	441	124	2158	75		
Masa Monovalente	42	16	30	13	89	93		

¹ Promedio de la etapa y rendimientos globales de la tabla 2.3.1.2C

² Promedio de la etapa y rendimientos globales de la tabla 2.3.1.3C

³ Promedio de la etapa y rendimientos globales de la tabla 2.3.1.4C

Nota: el % de los valores del rendimiento global anteriores se calcularon como el promedio del % de los valores del rendimiento global para cada etapa del proceso de las tablas 2.3.1.2C, 2.3.1.3C, y 2.3.1.4C. Como resultado, el % de rendimientos globales en cada etapa no es coherente con el % de rendimientos globales que se calcularían multiplicando cada % de rendimientos de la etapa sucesivos en esta tabla. El método de cálculo usado aquí refleja mejor los rendimientos del proceso reales a través de la campaña.

TABLA 2.3.1.1 C
CTM-1 Resumen de Datos del Ensayo QC – Resultados del Ensayo de Liberación de Masa Monovalente

	Tipo BiHarbin/07/94							AVSydney/05/97							AVBeijing/262/95		
	CAZ026	CAZ027	CAZ028	CAZ025	CAZ029	CAZ030	CAZ034	CAZ031	CAZ032	CAZ033							
Certificado de Análisis (C de A) ENSAYO ESPECIFICACIÓN Cosecha del Virus (Sin estabilizar)																	
▪ Micoplasma	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	NA	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	
▪ M.	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	NA	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	
▪ ALY (ELISA)	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	NA	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	
▪ Virus extraño <i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	NA	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	
▪ Ensayo de RT	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	NA	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	
▪ Genotipo	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	NA	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	
▪ Fenotipo	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	NA	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	
▪ Atenuación	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	NA	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	
▪ Identidad de DICT ₅₀																	
Neutralizado	< 1,3	< 1,3	< 1,4	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3	NA	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3	< 1,3	
Masa Monovalente (concentrado zonal filtrado esterilizado)	8,7	8,3	8,6	9,1	7,9	8,2	9,65	8,8	9,1	8,8	NA	8,8	8,8	9,1	9,1	9,1	
▪ Esterilidad	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	NA	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	Aprobado	
Disposición del Lote	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Rechazado	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	Liberación	

NA – No Aplicable (ensayos no realizados)