

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 536 322**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 39/155** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.12.2004 E 04814040 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.03.2015 EP 1701738**

54 Título: **Procedimiento para producir composiciones de VSR estables en almacenamiento**

30 Prioridad:

**17.12.2003 US 530325 P**

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

**22.05.2015**

73 Titular/es:

**WYETH LLC (100.0%)  
235 East 42nd Street  
New York, NY 10017-5755 , US**

72 Inventor/es:

**LOOK, JEE, LOON;  
FROLOV, VLADIMIR, G. y  
KONAR, NANDINI**

74 Agente/Representante:

**CARPINTERO LÓPEZ, Mario**

**ES 2 536 322 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Procedimiento para producir composiciones de VSR estables en almacenamiento

**Campo de la invención**

5 La presente invención se refiere, en general, a los campos de la virología, la formulación viral y al desarrollo de procesos. Más particularmente, la invención se refiere a procedimientos para minimizar la pérdida de potencia del VSR durante la liofilización y para producir composiciones de virus estables durante el almacenamiento, en las que las composiciones son estables durante el almacenamiento como una composición sólida liofilizada.

**Antecedentes de la invención**

10 El virus respiratorio sincitial humano (VSR) y el virus de la parainfluenza (PIV), miembros de la familia de los paramixovirus, son los principales patógenos responsables de la enfermedad respiratoria grave en lactantes y niños pequeños (Glezen *et al.*, 1981; Chanock *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1978). Dos grupos del VSR, el grupo A (VSR-A) y el grupo B (VSR-B), circulan simultáneamente durante las epidemias invernales anuales, aunque normalmente se observa una predominancia de las infecciones del grupo A (McConnochie *et al.*, 1990; Stark *et al.*, 1991). El PIV de tipo 3 (PIV-3) es una causa frecuente de bronquiolitis, neumonía y crup. Juntos, el VSR y el PIV-3 representan hasta  
15 el 30 % de todas las hospitalizaciones de lactantes y niños pequeños por enfermedades de las vías respiratorias (Crowe, 1995). El PIV de los tipos 1 y 2 (PIV-1 y PIV-2) también son causas frecuentes de crup. El VSR también se ha notificado que produce una morbilidad significativa en individuos inmunocomprometidos y en ancianos. Anualmente se producen sesenta y cinco millones de infecciones por VSR en todo el mundo, que dan lugar a 160.000 fallecimientos (Robbins y Freeman, 1988). Solo en Estados Unidos, 100.000 niños son hospitalizados  
20 anualmente con casos graves de neumonía y bronquiolitis a causa de una infección por el VSR (Glezen *et al.*, 1986; Katz, 1985). Se ha estimado que los cuidados intrahospitalarios y ambulatorios para niños con infecciones por el VSR en EE.UU. en 1992 cuestan más de 340 millones de dólares americanos anuales (Wert y Sullender, 1992). Los comités asesores de vacunas de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (Crowe, 1995) y el Instituto Nacional de Alergia y Enfermedades Infecciosas (NIAID) han clasificado al VSR en segundo lugar, detrás del VIH, para el desarrollo de una vacuna, mientras que la preparación de una vacuna eficaz contra el PIV (por ejemplo, PIV de tipo 3) se clasifica en las diez vacunas principales que se consideran prioritarias para desarrollo de vacunas.

Por tanto, sigue existiendo la necesidad de la capacidad para modificar una vacuna eficaz contra el VSR y/o el PIV que pueda prevenir enfermedades respiratorias graves en lactantes, niños pequeños, ancianos e inmunocomprometidos. El uso de VST y/o PIV atenuados vivos para controlar las enfermedades respiratorias es uno  
30 de los abordajes más prometedores. Se ha desarrollado una serie de cepas del VSR vivos atenuados y se analizaron en niños seronegativos para el VSR durante los últimos veinte años. Los abordajes más perseguidos para la atenuación viva de VSR han sido VRS sometidos a frío (cp), mutantes del VSR sensibles a la temperatura (ts) y mutantes del VSR sensibles a la temperatura y sometidos a frío (cpts) (Kneyber y Kimpen, 2002). Actualmente se están evaluando mutantes del VSR tales como cpts-248, cpts-248/404, cpts-530 y el mutante del PIV-3 cp-45 en  
35 laboratorios y ensayos clínicos.

Además de la necesidad de identificar y desarrollar una combinación de composiciones inmunogénicas de VSR, PIV o VSR/PIV vivos atenuados eficaz, actualmente existe la necesidad de métodos de producción de composiciones de VSR y/o PIV estables durante el almacenamiento y composiciones inmunogénicas de las mismas. Por ejemplo, el VSR es un virus termolábil, que se inactiva en menos de tres meses durante el almacenamiento a -65 °C a -86 °C  
40 (Hambling, 1964; Wulff *et al.*, 1964; Gupta *et al.*, 1996). Por tanto, es altamente deseable identificar métodos para producir composiciones inmunogénicas del VSR, PIV o VSR/PIV que sean estables durante el almacenamiento.

El documento de Tannock G et al (1987), Journal of Clinical Microbiology, vol.25, p.1769 - 1771 describe que las cepas del virus sincitial respiratorio liofilizadas en presencia de un estabilizante adecuado se pueden transportar como muestras no refrigeradas sin pérdidas de infectividad indebidas.

45 El documento WO03086443 describe un procedimiento de preparación de una composición de partículas liofilizadas para la administración intranasal de un material bioactivo, comprendiendo el procedimiento: Pulverizar una formulación líquida que comprende el material bioactivo para formar gotas; congelar las gotas mediante inmersión en un fluido frío; secar las gotas para formar partículas de polvo; y recuperar las partículas, en el que las partículas comprenden un tamaño físico promedio que varía de aproximadamente 10 um a aproximadamente 200 um,  
50 preparando de este modo las partículas liofilizadas para administración intranasal (reivindicación 1). De acuerdo con la reivindicación 3 del documento WO03086443, el material bioactivo puede comprender el virus sincitial respiratorio.

Adicionalmente, potenciar la estabilidad durante el almacenamiento de otras composiciones inmunogénicas se ha reconocido desde hace tiempo como objetivo importante para mejorar el impacto de las vacunas sobre la salud mundial (Melnick y Wallis, 1963; Rasmussen *et al.*, 1973; Ayra, 2001; Hilleman, 1989; Lemon y Milstein, 1994) Por  
55 tanto, existe la necesidad en la técnica de formulación de virus y desarrollo de procesos de procedimientos para producir composiciones de virus estables durante el almacenamiento, tales como virus de herpes simple, citomegalovirus, virus de Epstein-Barr, virus de varicela zóster, virus de las paperas, virus del sarampión, virus de la gripe, poliovirus, rinovirus, adenovirus, virus de la hepatitis A, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus de

Norwalk, togavirus, alfavirus, virus de la rubéola, virus de la rabia, virus de Marburg, virus del ébola, virus del papiloma, virus del poliovirus, metaneumovirus, coronavirus, virus de la estomatitis vesicular, virus de la encefalitis equina venezolana y similares.

### **Sumario de la invención**

5 La invención, en su sentido más amplio, es como se define en las reivindicaciones independientes.

La invención se refiere a procedimientos como se ha definido en las reivindicaciones para minimizar la pérdida de potencia del VSR durante la liofilización y para producir composiciones de virus estables durante el almacenamiento que comprenden un virus sincitial respiratorio (VSR).

10 Por tanto, la invención se refiere a un procedimiento para minimizar la pérdida de potencia del VSR durante la liofilización y para producir una composición de virus estable durante el almacenamiento que comprende virus sincitial respiratorio (VSR), comprendiendo el procedimiento: (a) congelar una composición de virus de entre aproximadamente 100 µl a aproximadamente 5 ml por debajo de su temperatura de transición vítrea en un tiempo de 60 minutos o menos a una velocidad de -0,5 °C a -2,5 °C por minuto, en el que la composición de virus se formula en una solución de tampón fosfato de 5,0 mM a aproximadamente 20 mM que comprende sales monobásicas y dibásicas de sodio y/o de potasio y que tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8; y (b) liofilizar la composición de virus, en la que la composición de virus liofilizada es estable durante al menos un año a una temperatura de almacenamiento de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C.

20 En una realización, la temperatura de transición vítrea es una temperatura de aproximadamente -45 °C y se alcanza en un tiempo de aproximadamente sesenta minutos o menos. En otra realización, la temperatura de transición vítrea es una temperatura de aproximadamente -35 °C y se alcanza en un tiempo de aproximadamente cuarenta minutos o menos. En otra realización más, la temperatura de transición vítrea de aproximadamente -35 °C se alcanza en un tiempo de aproximadamente veinte minutos o menos. En una realización, el volumen de la composición de virus es de aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 1,0 ml. En determinadas realizaciones, la composición de virus está comprendida en un medio recipiente adecuado, en la que el medio recipiente se define adicionalmente como un vial, un tubo o un dispositivo de pulverización nasal. En una realización, el VSR se define además como un VSR del grupo A (VSR-A), un VSR del grupo B (VSR-B) o un VSR recombinante quimérico que comprende uno o más antígenos de cada uno de los grupos A y B (VSR-AB).

30 La composición de virus de volumen pequeño se formula en una solución de tampón fosfato de 5,0 mM a aproximadamente 20 mM que comprende sales monobásicas y dibásicas de sodio y/o potasio y que tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8. En otras realizaciones, la solución de tampón fosfato de 5,0 mM a aproximadamente 20 mM que comprende además ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico (HEPES) de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 25 mM. En otras determinadas realizaciones, la solución de tampón fosfato de 5,0 mM a aproximadamente 20 mM comprende además cloruro de magnesio de 0,01 mM a aproximadamente 1 mM y cloruro cálcico de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM.

35 En determinadas realizaciones, una composición de virus de volumen pequeño se formula en una solución de tampón fosfato 10 mM que comprende sales monobásicas y dibásicas de sodio y/o potasio y que tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8. En otras realizaciones, la solución de tampón fosfato 10 mM comprende HEPES de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 25 mM. En otras determinadas realizaciones, la solución de tampón fosfato 10 mM comprende además cloruro de magnesio de 0,01 mM a aproximadamente 1 mM y cloruro cálcico de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM.

40 En una realización, la solución de tampón fosfato de 5,0 mM a aproximadamente 20 mM (pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8) que comprende HEPES de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de magnesio de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM y cloruro cálcico de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM, que comprende además sacarosa, ácido L(+)-glutámico, sal monosódica de ácido L(+)-glutámico, una mezcla de ácido L(+)-glutámico y monosódica de ácido L(+)-glutámico, albúmina humana (HA) y/o peptona de soja. En otras realizaciones, la solución de tampón fosfato de 5,0 mM a aproximadamente 20 mM, con un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8, que comprende HEPES de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de magnesio de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM y cloruro cálcico de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM, que comprende además aproximadamente 50 g/l de sacarosa, ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 4,9 mM o sal monosódica de ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 4,9 mM o una mezcla de los mismos y de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l de HA. En otra realización, la HA de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l está sustituido por aproximadamente 50 g/l de peptona de soja. En otras realizaciones más, la solución de tampón fosfato de 5,0 mM a aproximadamente 20 mM, con un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8, comprende HEPES de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de magnesio de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM y cloruro cálcico de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM, que comprende además aproximadamente 50 g/l de sacarosa, ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 4,9 mM o sal monosódica de ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 4,9 mM o una mezcla de los mismos y

de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l de HA y aproximadamente 50 g/l de peptona de soja.

En una realización, la solución de tampón fosfato 10 mM, con un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8, que comprende HEPES de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 12,5 mM, cloruro de magnesio de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,5 mM y cloruro cálcico de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,5 mM, que comprende además aproximadamente 50 g/l de sacarosa, ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 4,9 mM o sal monosódica de ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 4,9 mM o una mezcla de los mismos y de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l de HA. En otras realizaciones, la HA de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l está sustituido por aproximadamente 50 g/l de peptona de soja. En todavía otras realizaciones, la solución de tampón fosfato 10 mM, con un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8, comprende HEPES de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 12,5 mM, cloruro de magnesio de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,5 mM y cloruro cálcico de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,5 mM, comprende además aproximadamente 50 g/l de sacarosa, ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 2,45 mM o sal monosódica de ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 2,45 mM o una mezcla de los mismos y de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l de HA y aproximadamente 50 g/l de peptona de soja.

En una realización, la temperatura de almacenamiento de la composición de virus liofilizada estable durante el almacenamiento de volumen pequeño es de aproximadamente 5 °C. En determinadas otras realizaciones, la composición de virus liofilizada tiene una pérdida de menos de aproximadamente 1,0 lg de UFP tras un año de almacenamiento a de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C. En otra realización más, la composición de virus es al menos 4,0 log de UFP por 0,1 ml tras un año de almacenamiento a de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C.

En una realización, la liofilización de la composición de virus se define adicionalmente como (a) colocar de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 0,6 ml de la composición de virus en un vial y enfriar hasta una temperatura de aproximadamente 5 °C; (b) colocar el vial en un estante de liofilización y disminuir la temperatura del estante de 5 °C a -50 °C a una velocidad de aproximadamente -1,0 °C por minuto a aproximadamente -2,0 °C por minuto; (c) mantener la temperatura del estante a aproximadamente -50 °C durante 60 minutos; (d) reducir la presión de la cámara de liofilización a 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente -50 °C durante 30 - 60 minutos; (e) incrementar la temperatura del estante de -50 °C a 0 °C a una velocidad de aproximadamente 1,0 °C por minuto a aproximadamente 2,0 °C a aproximadamente 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 540 minutos a aproximadamente 720 minutos; (f) incrementar la temperatura del estante de 0 °C a 15 °C a una velocidad de aproximadamente 0,5 °C por minuto a aproximadamente 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente 15 °C durante aproximadamente 600 minutos a aproximadamente 720 minutos y (g) cargar el vial con gas nitrógeno y sellar herméticamente el vial.

En otra realización, la liofilización de la composición de virus se define adicionalmente como (a) colocar de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 0,6 ml de la composición de virus en un vial y enfriar hasta una temperatura de aproximadamente 5 °C; (b) enfriar un estante de liofilización hasta una temperatura de aproximadamente -70 °C; (c) colocar el vial en el estante de liofilización y mantener la temperatura a aproximadamente -70 °C durante 60 minutos; (d) reducir la presión de la cámara de liofilización a 13,33 Pa e incrementar la temperatura del estante de -70 °C a -50 °C a una velocidad de aproximadamente 1,0 °C por minuto; (e) incrementar la temperatura del estante de -50 °C a 0 °C a una velocidad de aproximadamente 1,0 °C por minuto a aproximadamente 2,0 °C por minuto a aproximadamente 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 540 minutos a aproximadamente 720 minutos; (f) incrementar la temperatura del estante de 0 °C a 15 °C a una velocidad de aproximadamente 0,5 °C por minuto a aproximadamente 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente 15 °C durante aproximadamente 600 minutos a aproximadamente 720 minutos y (g) cargar el vial con gas nitrógeno y sellar herméticamente el vial.

Características y ventajas preferidas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, a partir de las realizaciones preferidas de la misma, y a partir de las reivindicaciones.

### **Breve descripción de las figuras**

La Figura 1 muestra una representación esquemática de la colocación de los dispositivos BD Accuspray™ en el soporte de aluminio de 96 pocillos para congelar las formulaciones, que está marcado del siguiente modo: (1) un soporte de aluminio o de acero, (2) formulación cargada en el dispositivo, (3) dispositivo BD Accuspray, (4) tapones y (5) pocillos vacíos.

La Figura 2 muestra la cinética de la congelación de una formulación en un congelador a -70 °C frente a la congelación de la misma formulación con nitrógeno líquido. La formulación líquida se añadió a un dispositivo BD Accuspray™ y se realizó la congelación colocando el soporte de aluminio sobre una superficie de metal enfriada con nitrógeno líquido o colocando el soporte de aluminio en un estante de un congelador a -70 °C.

**Descripción detallada de la invención**

La invención, en su sentido más amplio, es como se define en las reivindicaciones independientes. La invención descrita a continuación en el presente documento aborda una necesidad en la técnica de procedimientos de producir composiciones de virus estables durante el almacenamiento que comprenden VSR. En ciertas realizaciones, la invención descrita a continuación en el presente documento aborda una necesidad en la técnica de procedimientos de producción de composiciones de virus estables durante el almacenamiento que comprenden el virus sincitial respiratorio (VSR) para uso en composiciones inmunogénicas que previenen o mejoran las enfermedades respiratorias en lactantes, niños pequeños, ancianos e inmunocomprometidos.

Por tanto, en ciertas realizaciones, la invención se refiere a procedimientos como se citan en las reivindicaciones para la producción de volúmenes pequeños de composiciones de virus liofilizadas. En una realización particular, la invención se refiere a procedimientos como se citan en las reivindicaciones para la producción de pequeños volúmenes de composiciones de virus liofilizadas, en los que la composición liofilizada es estable durante el almacenamiento durante al menos un año a una temperatura de almacenamiento de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C.

**A. Composiciones de virus**

El VSR pertenece al género *Pneumoviridae*, que se clasifica dentro de la familia de los Paramyxoviridae. El virión contiene un ARN monocatenario de sentido negativo de 15.222 pares de bases que codifica diez proteínas virales. Estas diez proteínas comprenden tres glucoproteínas asociadas con la cubierta denominadas G, F y SH; dos proteínas de la matriz M y M2, tres proteínas de la nucleocápside L, N y P, y las proteínas no estructurales 1B y 1C.

Dos grupos de VSR, el grupo A y el grupo B, se identifican sobre la base de las diferencias antigénicas en la proteína G y en menor medida la proteína F. Las diferencias antigénicas se pueden encontrar dentro de los dos grupos. La proteína G muestra un grado alto de variación con una homología de aminoácidos de solo un 53 % entre los grupos A y B del VSR y hasta un 20 % de diferencias en las secuencias de la proteína G dentro del grupo A del VSR. A continuación en el presente documento, "grupo A del VSR" se representa por "VSR-A" y "grupo B del VSR" se representa por "VSR-B".

Una composición del VSR estable durante el almacenamiento producida de acuerdo con uno de los métodos de la invención es cualquier VSR atenuado (por ejemplo, VSR-A atenuado y VSR-B atenuado) que incluye, entre otros, mutantes del VSR sometidos a frío (*cp*RSV), mutantes del VSR sensibles a la temperatura (*ts*RSV), mutantes del VSR sometidos a frío y sensibles a la temperatura (*cpts*RSV), mutantes del VSR adaptados al frío (*ca*RSV), mutantes del VSR de placa pequeña RSV (*sp*RSV), y similares. Por ejemplo, las patentes de EE.UU. números 5.882.651, 5.932.222, 5.993.824, 6.077.514 y 6.284.254 describen procedimientos para producir varios fenotipos del VSR atenuado. En una realización preferida, un VSR atenuado de la invención es *cpts*RSV 248/404 (ATCC VR2452), también conocido como LRSV-404 y todas las modificaciones recombinantes hechas de esta cepa, incluyendo las cepas VSR-AB recombinante. Otras cepas de VSR de ejemplo de la invención incluyen: (a) rA2cp248/404ΔSH (también conocido como LRSV-rA36); (b) rA2cp248/404/1030ΔSH (también conocido como LRSV-rA38); (c) rA2cp248/404/1030 (también conocido como LRSV-rA39); (d) rA2cp248/404ΔNS2 (también conocido como LRSV-rA41); (e) rABcp248/404/1030 (también conocido como LRSV-rAB1); (f) rABcp248/404ΔSH (también conocido como LRSV-rAB2); (g) rABcp248/404ΔNS2 (también conocido como LRSV-rAB4); (h) *cpts*RSV 530/1009 (ATCC VR2451) y todas las modificaciones recombinantes hechas a partir de esta cepa, incluyendo las cepas de VSR-AB recombinante tal como rA2cp530/1009ΔNS2 (también conocido como LRSV-rA42); rA2cp530/1009/404 (también conocido como LRSV-rA43); rABcp530/1009ΔNS2 (también conocido como LRSV-rAB3) y rABcp530/1009/404 (también conocido como LRSV-rAB6).

**B. Volúmenes pequeños de virus estable durante el almacenamiento**

La invención se refiere a un proceso para producir composiciones de virus estables durante el almacenamiento que comprenden VSR, proceso que es como se define en las reivindicaciones. El procedimiento comprende congelar la composición de virus por debajo de su temperatura de transición vítrea ( $T_v$ ) en un tiempo de sesenta minutos o menos y liofilizar la composición de virus. La composición de virus liofilizada, que es un polvo sólido o torta, es estable durante al menos un año a una temperatura de almacenamiento de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C. Los volúmenes pequeños de composiciones de virus liofilizadas estables durante el almacenamiento son de utilidad particular como composiciones inmunogénicas de una o varias dosis, en las que el polvo liofilizado se almacena durante una cantidad de tiempo dada.

Un "volumen pequeño" de una composición de virus es de entre aproximadamente 100 µl a aproximadamente 5 ml. En ciertas realizaciones, una composición de virus de pequeño volumen es de entre aproximadamente 200 µl a aproximadamente 1 ml. En una realización, el volumen de una composición de virus es 500 µl.

Por tanto, en ciertas realizaciones, una composición de virus de pequeño volumen se congela y se liofiliza en un medio recipiente adecuado. Típicamente, un medio recipiente adecuado, con respecto a las composiciones de virus de pequeño volumen, es un recipiente que puede soportar las temperaturas de congelación y liofilización y las presiones de vacío. Por ejemplo, un medio recipiente adecuado para la producción de composiciones estables

durante el almacenamiento de volumen pequeño es un vial, un tubo, una jeringa, una jeringa de dos etapas o un dispositivo de pulverización nasal. Véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. n° 5.489.266, 5.732.837 y 4.084.330. Se conocen medios de recipiente adicionales para liofilización y están disponibles fácilmente para el experto en la técnica.

## 5 1. Formulación de virus de volumen pequeño

Tal como se define a continuación en el presente documento, una "composición de VSR" comprende el virus (es decir, VSR), normalmente de aproximadamente  $10^3$  a  $10^7$  UFP de virus atenuado por ml y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Un vehículo farmacéuticamente aceptable incluye tampones, soluciones salinas, agua, agua para inyectables (WFI), estabilizantes proteicos, azúcares, aminoácidos, crioprotectores y similares.

10 Una composición de virus de volumen pequeño se formula en una solución de tampón fosfato de 5,0 mM a aproximadamente 20 mM que comprende sales monobásicas y dibásicas de sodio y/o potasio y que tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8. En determinadas realizaciones, la solución de tampón fosfato de 5,0 mM a aproximadamente 20 mM que comprende además HEPES de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de magnesio de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM y cloruro cálcico de de  
15 aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM.

En determinadas realizaciones, la composición de virus de pequeño volumen en un tampón fosfato de 5,0 mM a aproximadamente 20 mM (pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8) que comprende HEPES de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de magnesio de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM y cloruro cálcico de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM, que comprende  
20 además sacarosa, ácido L(+)-glutámico, sal monosódica de ácido L(+)-glutámico o una mezcla de los mismos, albúmina humana (HA) y/o peptona de soja. En otras determinadas formulaciones, la solución de tampón fosfato 10 mM (pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8), que comprende HEPES de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 12,5 mM, cloruro de magnesio de aproximadamente de 0,01 mM a aproximadamente 0,5 mM y cloruro cálcico de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 0,5 mM, que comprende además  
25 aproximadamente 50 g/l de sacarosa, ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 2,45 mM o sal monosódica de ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 2,45 mM o una mezcla de los mismos y aproximadamente 50 g/l de sacarosa y de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l de HA. En otras determinadas formulaciones, la HA de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l está sustituida por aproximadamente 50 g/l de peptona de soja (también conocida como Hy-Soy®; Quest  
30 International; Chicago, IL). En otra formulación, las composiciones de virus de volumen pequeño estables están formuladas en la solución de tampón fosfato de 5,0 mM a aproximadamente 20 mM (pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8), que comprende HEPES de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 25 mM, cloruro de magnesio de aproximadamente de 0,01 mM a aproximadamente 1 mM, cloruro cálcico de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM, aproximadamente 50 g/l de sacarosa, ácido L(+)-glutámico de aproximadamente  
35 0,049 mM a aproximadamente 4,9 mM o sal monosódica de ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 4,9 mM o una mezcla de los mismos, de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l de HA y aproximadamente 50 g/l de peptona de soja.

## 2. VELOCIDAD DE CONGELACIÓN Y LIOFILIZACIÓN DE VIRUS DE VOLUMEN PEQUEÑO

40 Como se ha indicado anteriormente, el proceso para producir una composición de virus estable durante el almacenamiento de volumen pequeño comprende (a) congelar la composición de virus por debajo de la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) en un tiempo de sesenta minutos o menos y (b) liofilizar la composición de virus, en la que la composición de virus liofilizada es estable durante al menos un año a una temperatura de almacenamiento de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C.

45 La  $T_v$  de una composición de virus normalmente es de aproximadamente -35 °C. La  $T_v$  de una composición de virus es inferior a aproximadamente -35 °C (por ejemplo, de aproximadamente -42 °C) en presencia de sales de "arrastré", tales como cloruro sódico. Por ejemplo, el cloruro sódico es un componente el medio de crecimiento del virus, pero no es un componente de la formulación de volumen pequeño. Por tanto, ciertas formulaciones de virus contendrán cantidades residuales (es decir, un "arrastré") de cloruro sódico y, como tales, la  $T_v$  puede ser inferior de aproximadamente -35 °C, pero normalmente no es inferior a aproximadamente -50 °C.

50 La expresión "temperatura de transición vítrea" o " $T_v$ " hace referencia al punto medio aproximado del intervalo de temperatura sobre el cual se produce la transición de un estado líquido a cristal. La velocidad a la cual la composición de virus alcanza su  $T_v$  es crucial para estabilidad del virus durante la liofilización (por ejemplo, véase el Ejemplo 2) y para la estabilidad durante el almacenamiento a largo plazo (por ejemplo, véase el Ejemplo 3). Dicho de otro modo, una velocidad de congelación más rápida tiene como resultado una composición de virus más estable,  
55 lo que da lugar a una menor pérdida de potencia de la composición de virus.

La expresión "velocidad de congelación" se refiere a la velocidad a la cual la composición de virus alcanza su  $T_v$ . La velocidad de congelación se puede calcular como una velocidad aproximada de reducción de la temperatura durante la congelación. Por ejemplo, si una temperatura inicial de una composición de virus era 5 °C y se congeló a su  $T_v$  de

-35 °C en un tiempo de 40 minutos, la “velocidad de congelación” sería de -1 °C/minuto. A condiciones similares, la cinética de congelación puede variar entre recipientes individuales o, en el caso de los volúmenes de carga, exhiben desviaciones a diferentes puntos. Por tanto, la velocidad de congelación es una velocidad de congelación promedio observada en los recipientes o medida en diferentes localizaciones del material cargado en una bandeja.

- 5 La velocidad de congelación de una composición de virus de pequeño volumen es de aproximadamente -0,5 °C/minuto a aproximadamente -2,5 °C/minuto. En una realización, la  $T_v$  se alcanza en un tiempo de sesenta minutos o menos. En otra realización, la  $T_v$  se alcanza en un tiempo de cuarenta minutos o menos. En todavía otra realización, la  $T_v$  se alcanza en un tiempo de veinte minutos o menos. La  $T_v$  de una composición de virus la determina fácilmente un experto en la técnica sin experimentación indebida usando, por ejemplo, mediciones termodinámicas tales como calorimetría de barrido diferencial (DSC) ((Hatley, 1992; Franks, 1992; Carpenter, 2002).

10 En una realización, un vial de liofilización que comprende una composición de virus de volumen pequeño se enfría previamente hasta una temperatura de aproximadamente 5 °C. El vial que contiene la composición de virus previamente enfriada se coloca después en un estante de liofilización y se congela hasta una temperatura de al menos -50 °C, a una velocidad de aproximadamente -1 °C/minuto a aproximadamente -2 °C/minuto. En otras realizaciones, el vial que contiene la composición de virus previamente enfriada se coloca directamente en un estante de liofilización previamente enfriado hasta una temperatura de -70 °C.

15 La liofilización (o secado por congelación) es una técnica de deshidratación en la que la solución de muestra (por ejemplo, una composición de VSR/PIV) se congela y el disolvente (por ejemplo agua o tampón) se retira mediante sublimación aplicando alto vacío. La técnica de liofilización es bien conocida para el experto en la técnica (Rey y May, 1999).

20 En una realización, una composición de virus de volumen pequeño liofilizada se prepara del siguiente modo: (a) colocar de aproximadamente 0,5 ml a 0,6 ml de la composición de virus en un vial y enfriar hasta una temperatura de aproximadamente 5 °C; (b) colocar el vial en un estante de liofilización y disminuir la temperatura del estante de 5 °C a -50 °C a una velocidad de aproximadamente -1,0 °C por minuto a aproximadamente -2,0 °C por minuto; (c) mantener la temperatura del estante a aproximadamente -50 °C durante 60 minutos; (d) reducir la presión de la cámara de liofilización a 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente -50 °C durante 30 - 60 minutos; (e) incrementar la temperatura del estante de -50 °C a 0 °C a una velocidad de aproximadamente 1,0 °C por minuto a aproximadamente 2,0 °C a aproximadamente 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 540 minutos a aproximadamente 720 minutos; (f) incrementar la temperatura del estante de 0 °C a 15 °C a una velocidad de aproximadamente 0,5 °C por minuto a aproximadamente 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente 15 °C durante aproximadamente 600 minutos a aproximadamente 720 minutos y (g) cargar el vial con gas nitrógeno y sellar herméticamente el vial.

25 En otra realización, la liofilización de la composición de virus se prepara del siguiente modo: (a) colocar de aproximadamente 0,5 ml a 0,6 ml de la composición de virus en un vial y enfriar hasta una temperatura de aproximadamente 5 °C; (b) enfriar un estante de liofilización hasta una temperatura de aproximadamente -70 °C; (c) colocar el vial en el estante de liofilización y mantener la temperatura a aproximadamente -70 °C durante 60 minutos; (d) reducir la presión de la cámara a 13,33 Pa e incrementar la temperatura del estante de -70 °C a -50 °C a una velocidad de aproximadamente 1,0 °C por minuto; (e) incrementar la temperatura del estante de -50 °C a 0 °C a una velocidad de aproximadamente 1,0 °C por minuto a aproximadamente 2,0 °C por minuto a aproximadamente 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 540 minutos a aproximadamente 720 minutos; (f) incrementar la temperatura del estante de 0 °C a 15 °C a una velocidad de aproximadamente 0,5 °C por minuto a aproximadamente 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente 15 °C durante aproximadamente 600 minutos a aproximadamente 720 minutos y (g) cargar el vial con gas nitrógeno y sellar herméticamente el vial.

35 La composición de virus liofilizada de volumen pequeño (es decir, la torta liofilizada) tiene una pérdida de menos de aproximadamente 1,0 log de UFP resultante de la liofilización y una pérdida de menos de aproximadamente 1,0 log de UFP tras un año de almacenamiento a aproximadamente 1 °C hasta aproximadamente 10 °C (véase, por ejemplo, el Ejemplo 2, el Ejemplo 3 y las Tablas 2 y 4 - 7). En aún otra realización, la composición de virus de volumen pequeño liofilizada es al menos 4,0 log UFP por 0,2 ml tras un año de almacenamiento a de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C.

## F. Ejemplos

Los ejemplos siguientes se llevan a cabo usando técnicas estándar, que son bien conocidas y rutinarias para los expertos en la técnica, excepto donde se describa lo contrario en detalle. Los siguientes ejemplos se presentan con fines ilustrativos y no deben interpretarse de ningún modo como limitantes del alcance de la invención.

### 55 Ejemplo 1

#### Componentes de formulación de VSR y PIV

Las muestras de VSR y/o de PIV descritas en el presente documento se formularon en una de las siguientes recetas

tamponadas con fosfato siguientes, denominadas "Formulación A1" a "Formulación E2", del siguiente modo:

**Formulación A1:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 2,5 Mm, cloruro de magnesio 0,1 mM, cloruro cálcico 0,1 mM, ácido L(+)-glutámico 0,49 mM, 50 g/l de sacarosa y 1,0 g/l de HA. HA es albúmina humana Grifols® al 20 % (p/v) (Grifols USA, Los Ángeles, CA; N° de catálogo 61953-0001-1).

5 **Formulación A2:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 12,5 Mm, cloruro de magnesio 0,5 mM, cloruro cálcico 0,5 mM, ácido L(+)-glutámico 2,45 mM, 50 g/l de sacarosa y 1,0 g/l de HA.

10 **Formulación A3:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 2,5 Mm, cloruro de magnesio 0,1 mM, cloruro cálcico 0,1 mM, ácido L(+)-glutámico 0,49 mM, 50 g/l de sacarosa y 1,0 g/l de HA recombinante. HA recombinante es albúmina humana al 20 % (p/v) expresada en células de levadura y comercializada con el nombre comercial Recombumin® (Delta Biotechnology Ltd., Nottingham, Reino Unido)

**Formulación A4:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 12,5 Mm, cloruro de magnesio 0,5 mM, cloruro cálcico 0,5 mM, ácido L(+)-glutámico 2,45 mM, 50 g/l de sacarosa y 1,0 g/l de HA recombinante.

**Formulación B1:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 2,5 Mm, cloruro de magnesio 0,1 mM, cloruro cálcico 0,1 mM, ácido L(+)-glutámico 0,49 mM, 50 g/l de sacarosa y 10 g/l de HA.

15 **Formulación B2:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 12,5 Mm, cloruro de magnesio 0,5 mM, cloruro cálcico 0,5 mM, ácido L(+)-glutámico 2,45 mM, 50 g/l de sacarosa y 10 g/l de HA.

**Formulación B3:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 2,5 Mm, cloruro de magnesio 0,1 mM, cloruro cálcico 0,1 mM, ácido L(+)-glutámico 0,49 mM, 50 g/l de sacarosa y 10 g/l de HA recombinante.

20 **Formulación B4:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 12,5 Mm, cloruro de magnesio 0,5 mM, cloruro cálcico 0,1 mM, ácido L(+)-glutámico 2,45 mM, 50 g/l de sacarosa y 10 g/l de HA recombinante.

**Formulación C1:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 2,5 Mm, cloruro de magnesio 0,1 mM, cloruro cálcico 0,1 mM, ácido L(+)-glutámico 0,49 mM, 50 g/l de sacarosa, 50 g/l de peptona de soja (Hy Soy®) y 1,0 g/l de HA.

25 **Formulación C2:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 2,5 Mm, cloruro de magnesio 0,1 mM, cloruro cálcico 0,1 mM, ácido L(+)-glutámico 0,49 mM, 50 g/l de sacarosa, 50 g/l de peptona de soja y aproximadamente 1,0 g/l de HA recombinante.

**Formulación C3:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 2,5 Mm, cloruro de magnesio 0,1 mM, cloruro cálcico 0,1 mM, ácido L(+)-glutámico 0,49 mM, 50 g/l de sacarosa, 50 g/l de peptona de soja y aproximadamente 1,0 g/l de HA recombinante.

30 **Formulación C4:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 12,5 Mm, cloruro de magnesio 0,5 mM, cloruro cálcico 0,1 mM, ácido L(+)-glutámico 2,45 mM, 50 g/l de sacarosa, 50 g/l de peptona de soja y aproximadamente 1,0 g/l de HA.

**Formulación D1:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 2,5 Mm, cloruro de magnesio 0,1 mM, cloruro cálcico 0,1 mM, ácido L(+)-glutámico 0,49 mM, 50 g/l de sacarosa y 50 g/l de peptona de soja.

35 **Formulación D2:** Tampón fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 12,5 Mm, cloruro de magnesio 0,5 mM, cloruro cálcico 0,5 mM, ácido L(+)-glutámico 2,45 mM, 50 g/l de sacarosa y 50 g/l de peptona de soja.

## Ejemplo 2

### Efecto de las velocidades de congelación sobre las potencias de las formulaciones de VSR y/o PIV de volumen pequeño durante la liofilización

40 En este ejemplo, se estudiaron las velocidades de congelación de las formulaciones de VSR y/o PIV de volumen pequeño para determinar las condiciones óptimas de congelación necesarias para minimizar la pérdida de potencia del virus.

Inicialmente se analizaron tres muestras que contenían LRSV-404, PIV3-cp45 y una combinación de LRSV-404/PIV3-cp45 (Tabla 2). Las masas virales usadas en estas formulaciones se prepararon como materiales clínicos para ensayos clínicos con seres humanos de fase 1 y de fase 2. Cada muestra de virus se formuló usando la "Formulación A1", como se establece en el Ejemplo 1. Las muestras se cargaron en viales de 2 ml (0,6 ml por vial), se enfriaron previamente hasta una temperatura de aproximadamente 5 °C y después se colocaron sobre un estante previamente enfriado (-50 °C) del liofilizador. La temperatura de transición vítrea ( $T_v$ ) de la composición de virus (aproximadamente -35 °C ± 5 °C) se alcanzó en aproximadamente cuarenta minutos, correspondiente a una velocidad de congelación de aproximadamente -1,0 °C por minuto. Después de congelar se aplicó un ciclo de liofilización que incluía un secado primario a 0 °C, seguido de un secado secundario a 15 °C.



TABLA 2

POTENCIA DE FORMULACIONES VÍRICAS DE VOLUMEN PEQUEÑO ANTES Y DESPUÉS DE LA LIOFILIZACIÓN		
Virus	Potencia (log UFP/ml) antes de la liofilización	Potencia (log UFP/ml) después de la liofilización*
LRSV-404	6,5	6,5
PIV3-cp45	7,7	7,1
LRSV-4041	6,5	6,3
PIV3-cp451	7,7	7,5

(a) \* = las muestras se congelaron a -1 °C/minuto

(b) LRSV-4041; la potencia de LRSV-4041 determinada a partir de una formulación combinada de LRSV-404/PIV-cp45.

(c) PIV-cp451; la potencia de PIV-cp451 determinada a partir de una formulación combinada de LRSV-404/PIV-cp45.

- 5 El análisis de la potencia del virus se realizó para masas virales iniciales, el material viral en viales después de la etapa de congelación y las muestras liofilizadas (inmediatamente tras la liofilización). El VSR se analizó usando el ensayo de Unidad de Formación de Placas (UFP) y células Vero (ATCC, nº de catálogo CCL-18). El ensayo incluyó
- 10 (a) la preparación de monocapas de células en placas de 24 pocillos, (b) la preparación de diluciones por 10 de las muestras de referencia y de ensayo, (c) la infección de las células, (d) la incubación de las placas durante aproximadamente 5 días a 32 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> y (e) la fijación de las células y la inmunotinción para visualizar las placas. El PIV se analizó usando el ensayo de Unidad Formadora de Placas y células LCC-MK2 que incluyó (a) la preparación de monocapas de células en placas de 24 pocillos, (b) la preparación de diluciones por 10 de las muestras de referencia y de ensayo, (c) la infección de las células, (d) la incubación de las placas durante aproximadamente 4 días a 32 °C y 5 % de CO<sub>2</sub> y (e) la fijación de las células y la inmunotinción para visualizar las placas. Para ambos ensayos, los resultados de las pruebas de potencia se consideraron aceptables, si la potencia de las muestras de referencia determinada a partir del ensayo fue de  $\pm 0,5$  log UFP del valor registrado.
- 15 Los resultados de las pruebas de potencia realizadas para las formulaciones de VSR, PIV y VSR/PIV se muestran en la Tabla 2. Los datos indican una pérdida mínima de potencia para las formulaciones congeladas a una velocidad de aproximadamente -1,0 °C por minuto. Los resultados de este experimento también confirmaron que VSR y PIV son compatibles en una formulación combinada.
- 20 La estabilidad de VSR y/o PIV se analizó adicionalmente a velocidades de congelación más rápidas (-2 °C / minuto; Tabla 6) y más lentas ((-0,3 °C/minutos; Tabla 3) y con concentraciones variables de HA recombinante (rHA), HA, peptona de soja y combinaciones de los mismos. Las muestras de virus comprendían LRSV-404, LRSV-rA38, LRSV-rA42 o masas virales líquidas preparadas para ensayos clínicos con seres humanos de fase 1 y de fase 2. Cada muestra de virus se formuló usando la formulación como se indica en la segunda columna de las Tablas 3 – 6.
- 25 Las muestras de virus se cargaron en un vial de 2 ml (0,5 ml o vial), se enfriaron previamente hasta una temperatura de aproximadamente 5 °C y después se colocaron en un estante del liofilizador. Las muestras congeladas se liofilizaron usando ciclos que incluyeron un secado primario a 0 °C, seguido de un secado secundario a 15 °C.
- 30 La prueba de la potencia se realizó para masas virales iniciales, materiales en viales después de congelar y muestras liofilizadas (inmediatamente después de la liofilización). Los resultados de las pruebas de potencia indicaron una reducción significativa de las potencias del VSR y del PIV en las muestras congeladas a aproximadamente -0,3 °C por minuto (Tabla 3) y una estabilidad alta del VSR o del PIV en las formulaciones congeladas a velocidades más rápidas de -1 °C por minuto (Tabla 4 y Tabla 5) y -2 °C por minuto (Tabla 6).

TABLA 3

<b>POTENCIA DE LAS FORMULACIONES DEL VSR DE VOLUMEN PEQUEÑO CONGELADAS A 0,3 °C/MINUTO</b>				
<b>Virus</b>	<b>Formulación<sup>1</sup></b>	<b>Potencia (log UFP/ml) antes de la liofilización</b>	<b>Potencia (log UFP/ml) después de la liofilización</b>	<b>Velocidad de congelación</b>
RSV-404	A1	7,1	3,4	-0,3 °C/min
RSV-404	A3	7,2	3,8	-0,3 °C/min
RSV-404	B1	7,1	4,2	-0,3 °C/min
RSV-rA42	A2	6,3	3,9	-0,3 °C/min
RSV-rA42	A4	6,1	3,6	-0,3 °C/min
RSV-rA42	B2	6,3	3,4	-0,3 °C/min
RSV-rA42	C3	6,1	4,9	-0,3 °C/min
RSV-rA42	D2	6,1	4,4	-0,3 °C/min

Formulación<sup>1</sup>= las formulaciones A1-A4, B1, B2, C3 y D2 se describen en el ejemplo 1.

TABLA 4

<b>POTENCIA DE LAS FORMULACIONES DEL PIV DE VOLUMEN PEQUEÑO CONGELADAS A -1 °C/MINUTO</b>				
<b>Virus</b>	<b>Formulación<sup>1</sup></b>	<b>Potencia (log UFP/ml) antes de la liofilización</b>	<b>Potencia (log UFP/ml) después de la liofilización</b>	<b>Velocidad de congelación</b>
PIV3-cp45	A1	7,0	6,6	-1 °C/min
PIV3-cp45	A3	7,0	6,7	-1 °C/min
PIV3-cp45	B1	7,0	6,4	-1 °C/min
PIV3-cp45	B3	7,0	6,6	-1 °C/min
PIV3-cp45	C1	7,0	6,5	-1 °C/min
PIV3-cp45	C3	7,0	6,3	-1 °C/min
PIV3-cp45	D1	7,0	6,5	-1 °C/min

Formulación<sup>1</sup>= las formulaciones A1, A3, B1, B3, C1, C3 Y D1 se describen en el ejemplo 1.

TABLA 5

POTENCIA DE LAS FORMULACIONES DEL VSR DE VOLUMEN PEQUEÑO CONGELADAS A -1 °C/MINUTO				
<u>Virus</u>	Formulación <sup>1</sup>	Potencia (log UFP/ml) antes de la liofilización	Potencia (log UFP/ml) después de la liofilización	Velocidad de congelación
LRSV-404	A1	6,6	6,3	-1 °C/min
LRSV-404	C1	6,5	6,0	-1 °C/min
LRSV-rA42	A2	5,9	5,8	-1 °C/min
LRSV-rA42	D2	5,9	6,0	-1 °C/min
LRSV-rA38	A2	5,7	5,4	-1 °C/min
LRSV-rA38	B2	5,4	5,1	-1 °C/min
LRSV-rA38	C4	5,7	5,3	-1 °C/min
LRSV-rA38	D2	5,4	4,8	-1 °C/min

Formulación<sup>1</sup>= las formulaciones A1, A2, B2, C1, C4 Y D2 se describen en el ejemplo 1.

TABLA 6

POTENCIA DE LAS FORMULACIONES DEL VSR y PIV DE VOLUMEN PEQUEÑO CONGELADAS A -2 °C/MINUTO				
<u>Virus</u>	Formulación <sup>1</sup>	Potencia (log UFP/ml) antes de la liofilización	Potencia (log UFP/ml) después de la liofilización	Velocidad de congelación
PIV-cp45	B1	7,3	6,9	-2 °C/min
LRSV-404	B1	6,3	6,0	-2 °C/min
LRSV-rA38	B2	5,5	5,5	-2 °C/min
LRSV-rA38	B4	5,5	5,3	-2 °C/min

Formulación<sup>1</sup>= las formulaciones B1, B2 y B4 se describen en el ejemplo 1.

### 5 Ejemplo 3

#### Estabilidad durante el almacenamiento de las formulaciones de volumen pequeño que comprenden VSR o PIV

La estabilidad durante el almacenamiento de las formulaciones descritas en el Ejemplo 2 se evaluó mediante pruebas de potencia a diferentes puntos de tiempo que incluían 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses de almacenamiento a 5 °C. Los datos de estabilidad se resumen en la Tabla 7 a continuación, en la que los datos demuestran pérdidas mínimas de potencia de las composiciones de virus hasta un año de almacenamiento a 5 °C. La columna de Formulación en la Tabla 7 representa las formulaciones designadas en el ejemplo 1.

TABLA 7

DATOS DE FORMULACIÓN, VELOCIDAD DE CONGELACIÓN Y ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO PARA COMPOSICIONES DE VSR Y PIV											
Cepa	Formulación	Masa viral	Velocidad de congelación	*Pérdida por liof. (log UFP)	Potencia a 5 °C (log UFP/ml)					Pérdida de potencia a 1 año (log UFP)	
					0 ms.	3 ms.	6 ms.	9 ms.	12 ms.		
LRSV-404	A1	S	- 1 °C/min	-0,3	6,3	5,9	5,9	5,9	5,5	- 0,8	
PIV3-cp45	A1	SF	-1 °C/min	-0,4	6,6	6,3	5,9	6,0	5,6	- 1,0	
LRSV-rA42	A2	SF	- 1 °C/min	-0,1	5,8	5,4	5,2	4,9	4,8	- 1,0	
PIV3-cp45	B1	SF	- 1 °C/min	-0,6	6,4	6,2	6,1	5,9	5,7	-0,7	
LRSV-rA38	B2	SF	- 1 °C/min	-0,3	5,1	4,8	4,5	4,2	4,2	-0,9	
LRSV-404	C1	S	- 1 °C/min	- 0,0	6,0	6,0	6,2	6,0	5,7	-0,3	
PIV3-cp45	C1	SF	- 1 °C/min	-0,5	6,5	5,8	6,0	6,2	5,6	-0,9	
PIV3-cp45	C2	SF	- 1 °C/min	-0,7	6,3	5,7	5,9	5,8	5,5	- 0,8	
PIV3-cp45	D1	SF	- 1 °C/min	-0,5	6,5	5,7	5,4	6,1	5,8	-0,7	
LRSV-rA38	D2	SF	- 1 °C/min	-0,3	4,8	4,5	4,2	4,1	4,3	-0,5	

Liof.= abreviatura de liofilización  
ms.= abreviatura de meses  
S= el virus se cultivó en un medio compuesto por suero bovino fetal  
SF = el virus se propagó usando medio de crecimiento "sin suero"

**Ejemplo 4 (no ilustrativo de la invención)****5 Efecto de las velocidades de congelación sobre la potencia de las formulaciones de VSR y/o PIV de volumen aparente durante la liofilización**

Para optimizar el proceso de liofilización de la producción a gran escala de composiciones inmunogénicas que comprenden VSR, PIV o una combinación de los mismos, se analizaron diferentes velocidades de congelación para formulaciones de volumen de masa (grandes) de VSR y PIV.

10 La formulación RSV-404 a granel, que comprende tampón fosfato 10 mM a pH 7,0 (HEPES 2,5 mM, cloruro de magnesio 0,1 mM, cloruro cálcico 0,1 mM, sal monosódica de ácido L(+)-glutámico 0,49 mM, 50 g/l de sacarosa y 1 g/l de HA) se preparó y liofilizó en una bandeja de liofilización Lyoguard® de 1 l. La congelación del material se realizó en el estante de un liofilizador reduciendo la temperatura del estante de 5 °C a -45 °C en 45 minutos. La bandeja de liofilización permaneció en el estante (a -45 °C) durante 5 horas adicionales para permitir la formulación para congelar por debajo de la temperatura de transición vítrea. El tiempo real para alcanzar la temperatura de transición vítrea (aproximadamente -35 °C) fue de aproximadamente 2 horas, que correspondía a una velocidad de congelación de aproximadamente -0,3 °C por minuto. Después se aplicó un ciclo de liofilización de 90 horas, que incluía el secado primario a 0 °C seguido de secado secundario a 15 °C. El material a granel formulado inicial y el material liofilizado se analizaron para determinar la potencia mediante ensayo de UFP.

20 En otro experimento, la formulación con LRSV-rA39 se preparó utilizando la misma formulación, pero el material se liofilizó usando Bandejas de aluminio de tamaño pequeño con una capacidad de 50 ml. El material se congeló en un

estante del liofilizador mediante la reducción de la temperatura de 5 °C a -40 °C en 60 minutos. El tiempo real para alcanzar la temperatura de transición vítrea del material (aproximadamente -35 °C) fue de aproximadamente 1,5 horas, que correspondía a una velocidad de congelación de aproximadamente -0,4 °C por minuto. Después se aplicó un ciclo de liofilización de 24 horas, que incluía el secado primario a 0 °C seguido de secado secundario a 15 °C. El material a granel formulado inicial y el material liofilizado se analizaron para determinar la potencia mediante ensayo de UFP.

Como alternativa se prepararon otras dos formulaciones de VSR utilizando liofilización a granel en bandejas de liofilización Lyoguard® de 1 l. LRSV-rA38 y LRSV-404 (cultivadas en medio sin suero) se formularon por separado con fosfato 10 mM (pH 7,0) que comprende HEPES 12,5 mM, cloruro de magnesio 0,5 mM, cloruro cálcico 0,5 mM, ácido L(+)-glutámico 2,45 mM, 50 g/l de sacarosa y 10g/l de HA. Las composiciones de virus se congelaron sumergiendo las bandejas en un baño de nitrógeno líquido durante al menos 20 minutos. Después, las bandejas de liofilización se colocaron en un estante de liofilización previamente enfriado (-50 °C) y se liofilizaron usando un ciclo de 120 horas que incluyó (a) inicio del secado primario con vacío fijado a 13,33 Pa; (b) una pendiente de temperatura (a 0,23 °C/minuto) hasta una temperatura del estante de -23 °C; (c) mantener la temperatura a -23 °C durante 80 - 100 horas; (d) inicio de secado secundario con vacío fijado a 2,66 Pa; (e) una pendiente de temperatura (a 0,13 °C/minuto) hasta una temperatura del estante de 15 °C; (f) mantener la temperatura a 15 °C durante 30 - 40 horas; (g) aumentar la temperatura (a 0,17 °C/minuto) hasta una temperatura del estante de 25 °C y (h) mantener la temperatura a 25 °C durante 10 horas.

Las muestras de las masas virales formuladas y los materiales liofilizados se analizaron para determinar la potencia en un ensayo de UFP. En la Tabla 8 a continuación se enumeran datos que confirman que las velocidades de congelación son cruciales para la conservación de la potencia del virus durante los ciclos de liofilización. La congelación de las bandejas en los estantes de liofilización ("congelación lenta") tuvo como resultado una pérdida significativa de potencia en los materiales liofilizados (Tabla 8, columna 2) respecto a la congelación de las bandejas con nitrógeno líquido ("congelación rápida"), en la que la pérdida de potencia fue insignificante (Tabla 8, columna 3).

TABLA 8

<b>EFFECTO DE LA VELOCIDAD DE CONGELACIÓN SOBRE LA POTENCIA DEL VSR DURANTE LA LIOFILIZACIÓN A GRANEL</b>		
<b>ND*= no determinado</b>		
<b>Pérdida de potencia tras la liofilización a granel (log UFP)</b>		
<b>Cepa</b>	<b>Congelación en el liofilizador</b>	<b>Congelación rápida con nitrógeno líquido</b>
LRSV-404	-1,2	ND
LRSV- rA39	-3,5	ND
LRSV-404	ND*	0
LRSV-rA38	ND*	-0,6

#### **Ejemplo 5 (no ilustrativo de la invención)**

##### **Congelación rápida de formulaciones líquidas del VSR cargadas en dispositivos de pulverización nasal**

Una formulación líquida de LRSV-rA38 (cultivada en medio sin suero) se preparó en una solución de tampón fosfato 10 mM (pH 7,5) que comprende HEPES 25 mM, cloruro de magnesio 1,0 mM, cloruro de calcio 1,0 mM, 75 g / l de sacarosa y ácido L(+)-glutámico 4,9 Mm. La formulación se llenó en dispositivos de pulverización nasal BD Accuspray™ (0,23 ml por dispositivo) y cada dispositivo de pulverización nasal se insertó en un pocillo de un soporte de pulverización nasal de aluminio (por ejemplo, véase la FIG. 1) diseñado y fabricado por el solicitante. El soporte de pulverización nasal se hizo a partir de un bloque de aluminio que tiene 96 pocillos, en el que el diámetro del pocillo es 0,5 mm mayor que el diámetro del dispositivo de pulverización nasal. Los pocillos son lo suficientemente profundos como para permitir que la muestra del virus en cada dispositivo de pulverización nasal esté por debajo de la superficie superior del soporte (FIG. 1).

En el momento de la carga de los dispositivos de pulverización nasal, una placa de acero inoxidable (con dimensiones de 0,3 m x 0,2 m x 0,02 m) se colocó en un recipiente criogénico cargado con nitrógeno líquido y la placa se equilibró en el nitrógeno líquido (es decir, hasta que el nitrógeno líquido dejó de ebullición). Después del

equilibrado, el volumen de nitrógeno líquido en el recipiente criogénico se ajustó de tal manera que hubiera suficiente volumen para tocar la placa de metal, pero no para tocar el soporte de pulverización nasal. El soporte de pulverización nasal, que contiene los dispositivos para pulverización nasal cargados, se colocó sobre la placa "congelada" dentro del recipiente criogénico y se dejó "congelar rápidamente" durante al menos diez minutos. Los dispositivos de pulverización nasal se retiraron posteriormente del soporte de pulverización nasal, y los que la mitad de los dispositivos de pulverización nasal se almacenaron en un congelador fijado a -70 °C y la otra mitad de los dispositivos de pulverización nasal se almacenaron en un congelador fijado a -20 °C.

Una formulación líquida de LRSV-404 (cultivada en medio sin suero) también se preparó en una solución de tampón fosfato 10 mM (pH 7,5) que comprende HEPES 2,5 mM, cloruro de magnesio 0,1 mM, cloruro de calcio 0,1 mM, 75 g / l de sacarosa y ácido L(+)-glutámico 4,9 mM. La formulación se cargó en dispositivos de pulverización nasal BD Accuspray™ (0,23 ml por dispositivo), se congeló "rápidamente" y se almacenó como se ha descrito anteriormente.

Como alternativa, las muestras de LRSV-rA38 líquido y de LRSV-404 líquido se formularon y se introdujeron en los dispositivos de pulverización nasal como se ha descrito anteriormente, pero la congelación se realizó colocando los soportes de pulverización nasal en un estante de un congelador normal enfriado a -70 °C y se dejaron congelar durante 24 horas (congelación "lenta"). Los datos de la FIG. 2 muestran la cinética de la congelación "rápida" (FIG. 2, cuadrados rellenos) y congelación "lenta" (FIG. 2, cuadrados abiertos). Posteriormente, la mitad de los dispositivos de pulverización nasal se almacenó en un congelador que se fijó a -70 °C y la otra mitad de los dispositivos de pulverización nasal se almacenó en un congelador fijado a -20 °C.

La estabilidad durante el almacenamiento de las muestras se evaluó mediante pruebas de potencia a 0-meses, 1 mes, 3 meses, 4 meses y 6 meses. Los dispositivos de pulverización nasal (3 dispositivos por cada punto de tiempo) se descongelaron a temperatura ambiente durante aproximadamente una hora. El contenido de cada dispositivo de pulverización nasal se liberó en un tubo y después se analizó la potencia utilizando el ensayo de UFP.

Los datos presentados en las Tablas 9-12 resumen el efecto de una velocidad de congelación rápida sobre la estabilidad de las formulaciones líquidas de VSR.

TABLA 9

<b>LA ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO (POTENCIA) DE UNA FORMULACIÓN DE LRSV-RA38 LÍQUIDA CONGELADA A -196 °C Y ALMACENADA A -20 °C o -70 °C</b>		
	<b>Potencia (log UFP/ml)</b>	
<b>Tiempo (meses)</b>	<b>Temperatura de almacenamiento -20 °C</b>	<b>Temperatura de almacenamiento -70 °C</b>
0	5,6	5,5
1	5,7	5,5
3	5,6	5,5
4	5,6	5,6
6	5,6	5,6

\*\*La potencia de la formulación de LRSV-rA38 líquida antes de congelar a -196 °C fue 5,6 (log UFP/ml).

TABLA 10

<b>LA ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO (POTENCIA) DE UNA FORMULACIÓN DE LRSV-RA38 LÍQUIDA CONGELADA A -70 °C Y ALMACENADA A -20 °C o -70 °C</b>		
	<b>Potencia (log UFP/ml)</b>	
<b>Tiempo (meses)</b>	<b>Temperatura de almacenamiento -20 °C</b>	<b>Temperatura de almacenamiento -70 °C</b>
0	5,1	5,1
1	4,7	5,1
3	5,0	5,0
4	5,2	4,6
6	4,8	5,2

\*\*La potencia de la formulación de LRSV-rA38 líquida antes de congelar a -70 °C fue 5,6 (log UFP/ml).

TABLA 11

<b>LA ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO (POTENCIA) DE UNA FORMULACIÓN DE LRSV-404 LÍQUIDA CONGELADA A -196 °C Y ALMACENADA A -20 °C o -70 °C</b>		
	<b>Potencia (log UFP/ml)</b>	
<b>Tiempo (meses)</b>	<b>Temperatura de almacenamiento -20 °C</b>	<b>Temperatura de almacenamiento -70 °C</b>
0	5,9	5,9
1	5,8	5,6
3	6,1	6,1
4	6,0	5,9
6	5,9	6,0

\*\*La potencia de la formulación de LRSV-404 líquida antes de congelar a -196 °C fue 6,2 (log UFP/ml).

TABLA 12

LA ESTABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO (POTENCIA) DE UNA FORMULACIÓN DE LRSV-404 LÍQUIDA CONGELADA A -70 °C Y ALMACENADA A -20 °C o -70 °C		
Potencia (log UFP/ml)		
Tiempo (meses)	Temperatura de almacenamiento -20 °C	Temperatura de almacenamiento -70 °C
0	4,1	4,1
1	3,2	3,7
3	5,0	4,5
4	4,9	3,6
6	4,2	3,4

\*\*La potencia de la formulación de LRSV-404 líquida antes de congelar a -70 °C fue 6,2 (log UFP/ml).

5 A partir de estos datos se observó que las formulaciones de VSR congeladas con nitrógeno líquido (congelación "rápida") se mantuvieron estables a ambas temperaturas de almacenamiento (-20 °C y -70 °C) (Tabla 9 y Tabla 11). Las formulaciones de VSR congeladas en el estante del congelador a -70 °C (congelación "lenta") mostraron disminuciones en las potencias y una elevada variabilidad de la potencia en diferentes puntos de tiempo (Tabla 10 y Tabla 12).

10 La influencia de la congelación sobre el rendimiento del pulverizador se evaluó mediante la medición de la distribución del tamaño de la gota usando un Malvern SprayTec Particle Sizer. El análisis se realizó para los dispositivos pulverización cargados con la formulación LRSV-rA38 líquida descrita anteriormente. La distribución del tamaño de la gota se midió para los dispositivos pulverizadores (diez dispositivos por prueba) del siguiente modo: (a) dispositivo de pulverización nasal cargado con VSR, pero no congelado, (b) dispositivo de pulverización nasal cargado con VSR, congelado en nitrógeno líquido y almacenado durante 3 meses a -70 °C, (c) dispositivo de pulverización nasal cargado con VSR, congelado en nitrógeno líquido y almacenado durante 3 meses a -20 °C, (d) dispositivo de pulverización nasal cargado con VSR, congelado en un congelador a -70 °C y almacenado durante 3 meses a -70 °C, y (e) dispositivo de pulverización nasal cargado con VSR, congelado en un congelador a -70 °C almacenado durante 3 meses a -20 °C.

20 Dado que el dispositivo de pulverización nasal BD Accuspray™ está diseñado para realizar una vacunación intranasal mediante 2 pulverizaciones consecutivas (por separado en cada fosa nasal), se analizó cada pulverizador. El valor de la fracción de gotas (%) con un tamaño de partícula inferior a 10 µm se usó como criterio (el aumento de la masa de la fracción con el tamaño de partícula inferior a 10 µm era inaceptable). Los resultados del análisis se resumen en la Tabla 13. La congelación y el almacenamiento durante 3 meses de los dispositivos de pulverización congelados no afectaron el rendimiento del pulverizador. No se observaron incrementos en la masa total de gotas con un diámetro inferior a 10 µm.

25

TABLA 13

RENDIMIENTO DE PULVERIZACIÓN DE LOS DISPOSITIVOS BD ACCUSPRAY™ EN DIFERENTES CONDICIONES					
Temperaturas de congelación/almacenamiento	Orden de pulverización	Dv(50) promedio µm	Desviación estándar µm	Fracción < 10 µm %	Desviación estándar %
Carga fresca, no congelada	1	123,2	15,7	0,3	0,1
	2	168,5	23,2	0,4	0,1



RENDIMIENTO DE PULVERIZACIÓN DE LOS DISPOSITIVOS BD ACCUSPRAY™ EN DIFERENTES CONDICIONES					
Temperaturas de congelación/almacenamiento	Orden de pulverización	Dv(50) promedio $\mu\text{m}$	Desviación estándar $\mu\text{m}$	Fración < 10 $\mu\text{m}$ %	Desviación estándar %
Congelado en nitrógeno líquido/almacenado a -70 °C	1	122,3	15,1	0,2	0,0
	2	149,3	20,2	0,2	0,0
Congelado en nitrógeno líquido/almacenado a -20 °C	1	140,7	27,1	0,2	0,1
	2	162,1	22,2	0,2	0,1
Congelado a -70 °C/almacenado a -70 °C	1	140,8	46,3	0,2	0,1
	2	147,3	19,6	0,2	0,0
Congelado a -70 °C/almacenado a -20 °C	1	136,8	17,9	0,2	0,1
	2	154,6	9,5	0,2	0,0

### Referencias

- Patente de EE.UU. Nº 4.084.330
- Patente de EE.UU. Nº 5.489.266
- 5 Patente de EE.UU. Nº 5.732.837
- Patente de EE.UU. Nº 5.882.651
- Patente de EE.UU. Nº 5.932.222
- Patente de EE.UU. Nº 5.993.824
- Patente de EE.UU. Nº 6.077.514
- 10 Patente de EE.UU. Nº 6.284.254
- Patente de EE.UU. Nº 6.410.023
- Ayra, Vaccine, 19:595 - 597, 2001.
- 15 Carpenter et al., "Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory y practice". Pharm. Biotechnol., 13:109 - 33, 2002.
- Chanock et al., Pediatrics, 90:137 - 142., 1992.
- Crowe, "Current Approaches to the Development of vaccines against disease Caused by Respiratory Syncytial Virus (RSV) y Parainfluenza Virus (PIV): A meeting report from the WHO Programme for Vaccine Development", Vaccine, 13:415 - 421, 1995.
- 20 Franks, "Freeze-drying: from empiricism to predictability. The significance of glass transitions". Dev. Biol. Stand., 74:9 - 18.1992.
- Glezen et al., Am. J. Dis. Child. 140, 143 - 146, 1986.
- Glezen et al., J. Pediatr., 98:708 - 715, 1981.
- 25 Gupta et al., "Stabilization of RSV against thermal inactivation y freeze-thaw cycles for development y control of RSV vaccines y immune globulin," Vaccine, 14:1417 - 1420, 1996.
- Hambling, "Survival of the RSV during storage under various conditions", Br. J. Exp. Pathol., 45:647 - 655, 1964.
- Hatley, "The effective use of differential scanning calorimetry in the optimisation of freeze-drying processes y formulations". Dev. Biol. Stand., 74:105 - 119, 1992.
- Hilleman, Rev. Infect. Dis., 11(Suppl. 3):S613 - 616, 1989.
- 30 Katz, "New vaccine development establishing priorities", Vol. 1, Washington: National Academic Press., pp. 397 - 409, 1985.
- Kneyber y Kimpen, "Current Concepts on Active Immunization Against Respiratory Syncytial Virus For Infants y

## ES 2 536 322 T3

- Young Children", *Pediatr. Infect. Dis. J.*, 21:685 - 696, 2002.
- Lemon y Milstein, *Int. J. Technol. Assess. Health Care*, 10:177 - 184.1994.
- Martin et al., *J. Lancet*, 1035 - 1038, 1978.
- 5 McConnochie et al., "Variation in severity of respiratory syncytial virus infections with subtype", *J. Pediatr.* 117:52 - 62, 1990.
- Mcintosh y Chanock, *Fields Virology* (Fields y Knipe, Eds.) 1045 - 1075, Raven Press, Ltd., New York, 1990.
- Melnick y Wallis, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 112:894 - 897, 1963.
- Rasmussen et al., *Am. J. Dis. Child*, 126:465 - 469, 1973.
- 10 Rey y May, "Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical y Biological Products", New York: Marcel Dekker, 1999.
- Robbins y Freeman, *Sci. Am.*, 259:126 - 133, 1988.
- Stark et al., "Occurrence of respiratory syncytial virus subtypes in hospitalized children in Cleveland, Ohio from 1985 to 1988," *Pediatr. Pulmonol.*, 11:98 - 102, 1991.
- Wertz y Sullender, *Biotech*, 20:151 - 176, 1992.
- 15 Wulff et al., "RSV: Properties of strains propagated in monkey kidney cell cultures", *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 115:458 - 462, 1964.

## REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento para minimizar la pérdida de potencia del VSR durante la liofilización y para producir una composición de virus estable durante el almacenamiento que comprende virus sincitial respiratorio (VSR), comprendiendo el procedimiento: (a) congelar una composición de virus de entre aproximadamente 100 µl a aproximadamente 5 ml por debajo de su temperatura de transición vítrea en un tiempo de 60 minutos o menos a una velocidad de -0,5 °C a -2,5 °C por minuto, en el que la composición de virus es formulada en una solución de tampón fosfato de 5,0 mM a aproximadamente 20 mM que comprende sales monobásicas y dibásicas de sodio y/o de potasio y que tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8; y (b) liofilizar la composición de virus, en la que la composición de virus liofilizada es estable durante al menos un año a una temperatura de almacenamiento de aproximadamente 1 °C a aproximadamente 10 °C.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura de transición vítrea es de aproximadamente -40 °C a aproximadamente -50 °C.
3. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura de transición vítrea es de aproximadamente -30 °C a aproximadamente -40 °C.
4. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la temperatura de transición vítrea de aproximadamente -35 °C se alcanza en un tiempo de 40 minutos o menos.
5. El procedimiento de la reivindicación 3, en el que la temperatura de transición vítrea de aproximadamente -35 °C se alcanza en un tiempo de 20 minutos o menos.
6. El procedimiento de la reivindicación 5, en el que la composición de virus es formulada en una solución tampón 10 mM que comprende sales monobásicas y dibásicas de sodio y/o potasio y que tiene un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,8.
7. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la composición de virus comprende además ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etanosulfónico de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 25 mM.
8. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la composición de virus comprende además cloruro de magnesio de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM y cloruro cálcico de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM.
9. El procedimiento de la reivindicación 6, en el que la composición de virus comprende además HEPES de aproximadamente 0,25 mM a aproximadamente 25 mM HEPES, cloruro de magnesio de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM y cloruro cálcico de aproximadamente 0,01 mM a aproximadamente 1 mM.
10. El procedimiento de la reivindicación 9, en el que la composición de virus comprende sacarosa, ácido L(+)-glutámico o sal monosódica de ácido L(+)-glutámico o una mezcla de ácido L(+)-glutámico /sal monosódica de ácido L(+)-glutámico y albúmina humana (HA).
11. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que HA es nativa o recombinante.
12. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la composición de virus comprende además peptona de soja.
13. El procedimiento de la reivindicación 10, en el que la composición de virus comprende además aproximadamente 50 g/l de sacarosa, ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 2,45 mM o la sal monosódica de ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 2,45 mM o una mezcla de los mismos, y de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l de HA.
14. El procedimiento de la reivindicación 13, en el que de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 10,0 g/l de HA está sustituido por aproximadamente 50 g/l de peptona de soja.
15. El procedimiento de la reivindicación 12, en el que la composición de virus comprende aproximadamente 50 g/l de sacarosa, ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 2,45 mM o la sal monosódica de ácido L(+)-glutámico de aproximadamente 0,049 mM a aproximadamente 2,45 mM o una mezcla de los mismos, y de aproximadamente 1,0 g/l a aproximadamente 10 g/l de HA y aproximadamente 50 g/l de peptona de soja.
16. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la temperatura de almacenamiento es 5 °C.
17. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que la liofilización de la composición de virus en la etapa (b) comprende aproximadamente 0,2 ml a aproximadamente 1,0 ml de la composición de virus en un medio recipiente adecuado.

18. El procedimiento de la reivindicación 17, en el que el medio recipiente se define adicionalmente como un vial, un tubo o un dispositivo de pulverización nasal.
19. El procedimiento de la reivindicación 1, definido adicionalmente como:
- 5 (a) colocar de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 0,6 ml de la composición de virus en un vial y enfriamiento a una temperatura de aproximadamente 5 °C;
- (b) colocar el vial en un estante de la liofilización y disminuir la temperatura del estante de 5 °C a -50 °C a una velocidad de aproximadamente -1,0 °C por minuto a aproximadamente -2,0 °C por minuto;
- (c) mantener la temperatura del estante a aproximadamente -50 °C durante 60 minutos;
- 10 (d) reducir la presión de la cámara a 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente -50 °C durante 30-60 minutos;
- (e) aumentar la temperatura del estante de -50 °C a 0 °C a una velocidad de aproximadamente 1,0 °C por minuto a aproximadamente 2,0 °C a aproximadamente 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 540 minutos hasta aproximadamente 720 minutos;
- 15 (f) aumentar la temperatura del estante de 0 °C a 15 °C a una velocidad de aproximadamente 0,5 °C por minuto a aproximadamente 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente 15 °C durante aproximadamente 600 minutos hasta aproximadamente 720 minutos; y
- (g) rellenar el vial con gas nitrógeno y sellar herméticamente el vial.
20. El procedimiento de la reivindicación 1, definido adicionalmente como:
- 20 (a) colocar de aproximadamente 0,5 ml a aproximadamente 0,6 ml de la composición de virus en un vial y enfriar a una temperatura de aproximadamente 5 °C;
- (b) congelar un estante de liofilización a una temperatura de aproximadamente -70 °C;
- (c) colocar el vial en el estante de la liofilización y mantener la temperatura a aproximadamente -70 °C durante aproximadamente 60 minutos;
- 25 (d) reducir la presión de la cámara a aproximadamente 13,33 Pa y aumentar la temperatura del estante de -70 °C a -50 °C a una velocidad de aproximadamente 1,0 °C por minuto;
- (e) aumentar la temperatura del estante de -50 °C a 0 °C a una velocidad de aproximadamente 1,0 °C por minuto a aproximadamente 2,0 °C por minuto a aproximadamente 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente 0 °C durante aproximadamente 540 minutos hasta aproximadamente 720 minutos;
- 30 (f) aumentar la temperatura del estante de 0 °C a 15 °C a una velocidad de aproximadamente 0,5 °C por minuto a aproximadamente 13,33 Pa y mantener la temperatura del estante a aproximadamente 15 °C durante aproximadamente 600 minutos hasta aproximadamente 720 minutos; y
- (g) rellenar el vial con gas nitrógeno y sellar herméticamente el vial.

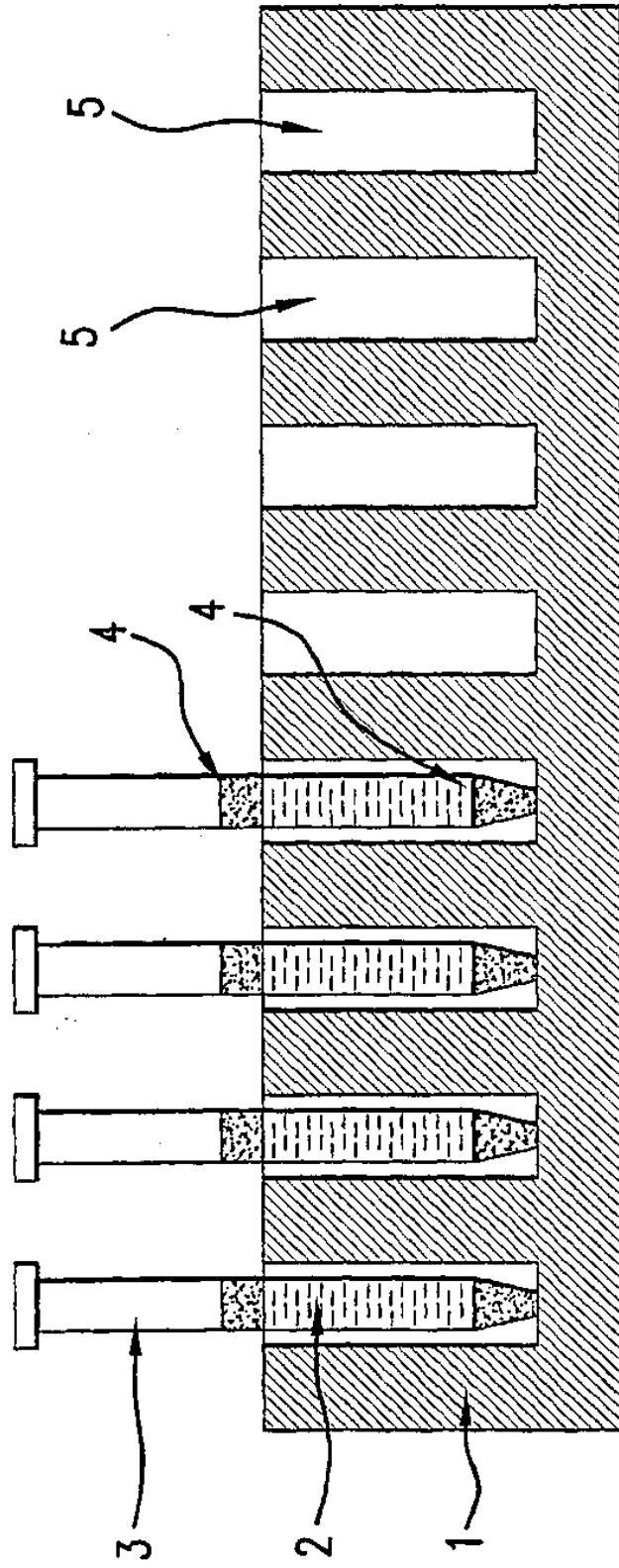


FIG.1

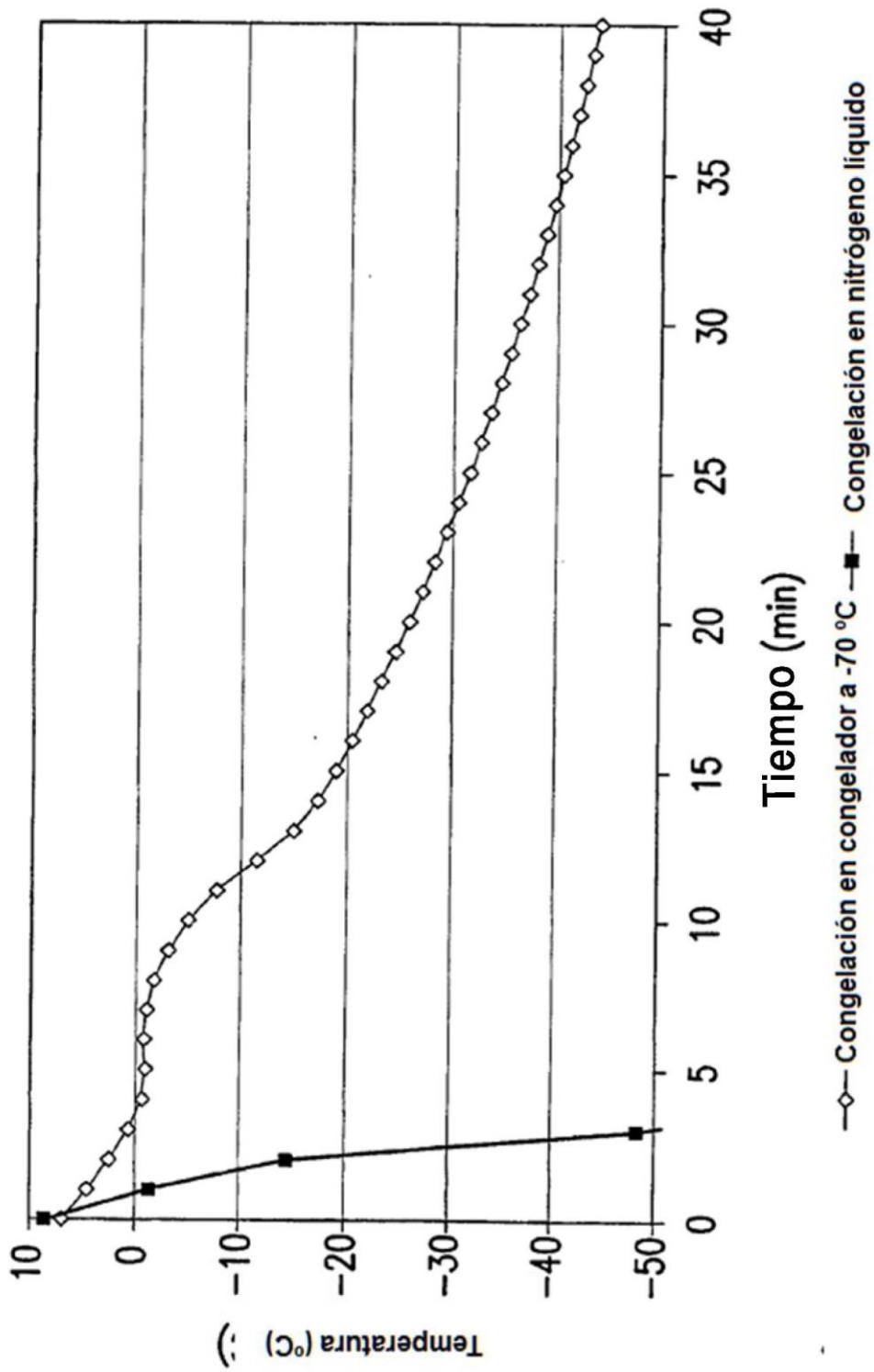


FIG.2