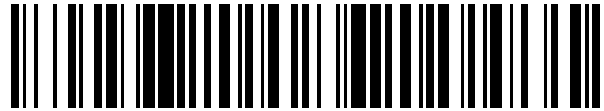


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 546 612**

51 Int. Cl.:

A61K 39/285 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **23.04.2002 E 02728888 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **26.08.2015 EP 1381389**

54 Título: **Vacuna contra la viruela**

30 Prioridad:

23.04.2001 US 840751

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

25.09.2015

73 Titular/es:

**SANOPI PASTEUR BIOLOGICS, LLC (100.0%)
38 Sidney Street
Cambridge, MA 02139, US**

72 Inventor/es:

**WELTZIN, RICHARD A. y
MONATH, THOMAS P.**

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 546 612 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

Vacuna contra la viruela

5 Antecedentes de la invención

El virus de la viruela, el agente causante de la viruela, es un miembro del género *Ortopoxvirus*, que también incluye la viruela de los monos, la viruela vacuna y los virus variolovacunales. La enfermedad causada por las cepas principales de la viruela se caracteriza por una dosis infecciosa baja (10 - 100 viriones), un periodo de incubación largo (un promedio de 12 días), fiebre, síntomas de constitución, erupción en progreso a etapa pustular, muerte en hasta el 30 % de los afectados y cicatrices faciales en los supervivientes. La enfermedad se transmite de una persona a otra a través de las vías respiratorias por contacto (gotas) y, posiblemente, por aerosol.

La viruela fue una de las causas más importantes de morbilidad y mortalidad en todo el mundo durante la primera mitad del siglo XX. Sin embargo, en parte debido a la falta de reservorio animal para el virus, el uso sistemático de una vacuna (virus variolovacunal vivo atenuado) fue muy eficaz en la lucha contra esta enfermedad. De hecho, entre 1967 y 1977, un programa global de erradicación de la viruela dio lugar a la eliminación de la enfermedad natural (Fenner et al., OMS, Ginebra, pág. 1460, 1988). Debido a la ausencia de la viruela y al riesgo de eventos adversos relacionados con la vacuna, la vacunación sistemática de los niños, el personal del hospital y el personal militar ha cesado, y actualmente solo se inmuniza a las personas que trabajan con el virus variolovacunal y virus relacionados en el laboratorio. Por lo tanto, una parte sustancial de la población mundial no tiene inmunidad a la viruela. La población restante tiene poca inmunidad residual, dado que la inmunidad de la vacuna dura sólo 5 años después de la vacunación primaria y menos de 20 años después de la revacunación. Por tanto, la erradicación de la viruela y el cese de la vacunación han creado vulnerabilidad en la población para cubrir un ataque o guerra biológica con el virus de la viruela. Si esto pasara, la propagación de la epidemia no estaría controlada por una barrera inmunológica en la población (Anon. (Editorial), *Lancet* 353:1539, 1999; Henderson, *Science* 283:1279 - 1282, 1999; Henderson et al., *J.A.M.A.* 281:2127 - 2137, 1999).

Debido a las incertidumbres en torno a la erradicación de la viruela, la vacuna se almacenó para uso de emergencia. En Estados Unidos, por ejemplo, inicialmente 155.000 viales de la vacuna (nominalmente 15,5 millones de dosis) producidos por Wyeth Laboratories se almacenaron bajo el control de los Centros para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC), de Atlanta, Georgia, EE.UU. En una reunión del Comité Asesor Nacional de Vacunas en enero de 1999, el CDC informó sobre el estado del almacén nacional de la vacuna contra la viruela. En ese momento, de los 15,5 millones de dosis en poder de Wyeth, 3,4 millones de dosis no habían pasado las pruebas de control de calidad y 10,3 millones habían pasado la fecha de caducidad especificada por la última prueba de control para la datación extendida, dejando 1,7 millones de dosis que cumplen las especificaciones de liberación (LeDuc, Presentation to the National Vaccines Advisory Committee, Washington D.C., Jan. 11 - 12.1999). Además de la oferta limitada, la vacuna se envasa en 100 viales de dosis, lo que restringe la distribución y aumenta la probabilidad de desperdicio durante una emergencia.

Además de las reservas de Estados Unidos, existe un suministro de la vacuna (Lister, cepa Elstree) almacenado en el Instituto Nacional de Salud Pública, Bilthoven, Países Bajos, y algunos otros países tienen suministros de la vacuna contra la viruela, que en el momento de la erradicación puede tener incluidos hasta 300 millones de dosis. Sin embargo, problemas similares de la estabilidad durante el almacenamiento han reducido esta oferta a menos de 50 millones de dosis (Henderson, *Science* 283: 1279 - 1282, 1999).

Kutinova et al., *Vaccine*, 1995; 13(5): 487 - 493 divulgan la búsqueda de la matriz óptima para las vacunas contra el virus variolovacunal recombinante y el estudio de tres cepas vacunales del virus variolovacunal y varias líneas de virus derivadas de las mismas. El documento US-A-4315914 divulga composiciones que comprenden una cepa atenuada del virus variolovacunal como ingrediente activo y su uso como agentes inmunopotenciadores celulares y antitumorales.

Sumario de la invención

La invención proporciona cepas estables del virus variolovacunal que se aíslan de células cultivadas en las que se ha propagado Dryvax® y que tienen características que los hacen adecuados para su uso como vacunas humanas contra la viruela. La invención también proporciona métodos de generación de estas cepas y métodos de su uso para prevenir la infección y la enfermedad de la viruela.

Por consiguiente, la invención proporciona una composición farmacéutica que comprende (i) una cepa clonal del virus variolovacunal atenuado que se aísla de células cultivadas en las que se ha cultivado Dryvax® o ACAM 1.000 (depósito ATCC N° PTA-3321) y es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica contra el virus de la viruela en un ser humano y, cuando se administra a un ser humano en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica contra el virus de la viruela en dicho ser humano, está aceptablemente atenuada en dicho ser humano; y (ii) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, donde dicho virus variolovacunal tiene la misma virulencia que la cepa del virus variolovacunal ACAM1000 (N° de

depósito en la ATCC PTA-3.321),

donde dicho virus variolovacunal tiene la misma inmunogeneicidad que la cepa del virus variolovacunal ACAM1000 (Nº de depósito en la ATCC PTA-3.321), y

5 donde dicho virus variolovacunal tiene el mismo patrón de digestión que la cepa del virus variolovacunal ACAM1000 (Nº de depósito en la ATCC PTA-3.321), cuando se digiere con la endonucleasa de restricción HindIII.

Preferentemente, el virus variolovacunal se produce en sustancialmente las mismas o mayores cantidades que Dryvax® cuando se inoculan en cultivos celulares.

10 La cepa clonal tiene la misma virulencia e inmunogenicidad que la cepa del virus variolovacunal ACAM1000 (depositada como Nº de Depósito en la ATCC PTA-3.321 el 19 de de abril de 2001; véase el clon 2, a continuación) cuando se analiza en modelos animales apropiados o en seres humanos. Preferentemente, dicho virus variolovacunal se produce en sustancialmente las mismas o mayores cantidades que la cepa del virus variolovacunal ACAM1000 cuando se inoculan en cultivos celulares. Dicho virus variolovacunal tiene el mismo
15 patrón de digestión que la cepa del virus variolovacunal ACAM1000 cuando se digiere con la endonucleasa de restricción HindIII. Un ejemplo de un virus variolovacunal que se incluye en la invención es ACAM1000 (nº de depósito en la ATCC PTA-3321).

20 La invención se refiere a una composición de la invención para su uso en un método para prevenir o tratar la infección por el virus de la viruela en un paciente mediante la administración al paciente de dicha composición farmacéutica, así como el uso de dicha composición en la preparación de un medicamento para este propósito. La composición farmacéutica puede administrarse al paciente mediante, por ejemplo, escarificación, en una cantidad comprendida entre, por ejemplo, 1×10^4 a 1×10^6 unidades formadoras de placas.

25 Una cepa clonal del virus variolovacunal atenuado para su uso como una vacuna se puede obtener mediante un método que implica (i) la propagación de Dryvax® en un sistema de cultivo celular, y (ii) aislar del sistema de cultivo celular una cepa clonal del virus variolovacunal que tiene sustancialmente la misma virulencia, inmunogeneicidad, características de crecimiento en cultivo, o patrón de digestión con endonucleasas de restricción que Dryvax® o la
30 cepa del virus variolovacunal ACAM1000. La virulencia del virus variolovacunal puede analizarse en este método mediante, por ejemplo, una prueba cutánea en conejo o una prueba de neurovirulencia en ratón lactante. Las características de crecimiento en cultivo pueden determinarse usando, por ejemplo, células diploides humanas (MRC-5). Preferentemente, el virus variolovacunal identificado utilizando este método, cuando se administra a un ser humano en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica contra el virus de la viruela en el ser humano, es aceptablemente avirulento en el ser humano.
35

La invención proporciona varias ventajas. Por ejemplo, previamente, la vacuna contra la viruela se produjo mediante inoculación del virus variolovacunal en la piel terneros, seguido de raspado de la piel de los terneros para la recolección del virus vivo. La preparación de virus bruto obtenido se sometió a una purificación mínima antes de su uso en la vacunación de receptores humanos, dejando abierta la posibilidad de contaminación por patógenos. Las
40 vacunas de la presente invención se producen en un sistema de cultivo celular que es aceptable para los estándares modernos para la fabricación de vacunas y está altamente purificado, de modo que se elimina este problema. Una ventaja adicional del uso de virus clonados, tales como los de la presente invención, es que es improbable que las características de dichos virus cambien durante la propagación y fabricación de la vacuna, en comparación con poblaciones mixtas de virus. De hecho, los inventores han demostrado que un virus de acuerdo con la invención
45 mantiene su fenotipo con varios pases y expansión en cultivo celular, está libre de contaminantes, y se puede producir en un cultivo celular en cantidades adecuadas para la fabricación de vacunas a gran escala.

Otras características y ventajas de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, de las figuras y de las reivindicaciones.

50

Breve descripción de las figuras

Las Figs. 1A-1D son una serie de gráficos que muestran los resultados de experimentos en los que se expuso a ratones lactantes a los clones variolovacunales indicados, a una preparación de virus variolovacunal policlonal, o a Dryvax®. Se muestra el número de ratones supervivientes y el promedio del tiempo de supervivencia después de estas exposiciones.

55

La Fig. 2 muestra un análisis de digestión con la enzima de restricción HindIII de clones de la vacuna de la invención, en comparación con una preparación de virus policlonales y Dryvax®.

60 Descripción detallada

La invención proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden cepas clonales de virus variolovacunales atenuados que se pueden utilizar en los métodos de vacunación contra la viruela (es decir, virus de la viruela). Como se describe adicionalmente más adelante, las cepas variolovacunales atenuadas de la invención se obtienen
65 aislando clones variolovacunales de cultivos celulares en los que se ha propagado Dryvax®. La invención también proporciona vacunas que incluyen estos virus variolovacunales para su uso en la prevención de la viruela. En el

presente documento también se describe métodos de obtención de tales cepas clonales de virus variolovacunas.

Las vacunas de la invención derivan de, y tienen características similares a, Dryvax® (cepa del New York City Board of Health, Wyeth Laboratories), que actualmente está autorizado por la Food and Drug Administration (FDA) y consiste en una población mixta de virus variolovacunas generados en piel de ternera. Las vacunas deben tener una virulencia aceptablemente atenuada para los seres humanos que son vacunados con ellas. Un nivel aceptable de atenuación puede ser, por ejemplo, un nivel que es similar a (por ejemplo, no difiere de una manera estadísticamente significativa de) la observada con Dryvax® y se puede determinar usando cualquiera de las pruebas *in vitro* o *in vivo* descritas a continuación. Una propiedad del virus variolovacunal es su neurotropismo, o capacidad para replicarse en las células del sistema nervioso central, causando inflamación (es decir, encefalitis). Preferentemente, las vacunas de la invención no son más neurotrópicas que Dryvax® y no causan encefalitis posvacunal en los pacientes tratados.

Las vacunas y los métodos de la presente invención se describen adicionalmente a continuación.

Indicaciones de uso

La indicación principal para el uso de las vacunas de la invención es para la prevención de la viruela en las poblaciones expuestas o potencialmente expuestas a la viruela después de un acto de bioterrorismo o de guerra biológica. La eficacia de las vacunas de la invención es ventajosamente alta (> 95 %), y las vacunas protegen tanto contra la transmisión de una persona a otra del virus como contra la exposición primaria a la exposición en aerosol a dosis altas a las armas biológicas. Teniendo en cuenta esta indicación principal, las vacunas de la invención pueden usarse, por ejemplo, para crear una nueva reserva nacional de la vacuna contra la viruela (variolovacunal) y la fabricación pueden continuar anualmente para mantener una reserva continua de la vacuna en la fecha durante un período prolongado de tiempo.

Las vacunas no son para uso de rutina, a excepción de para los trabajadores de laboratorio que están expuestos al virus variolovacunal, la viruela vacuna, la viruela del mono, la viruela, u otros miembros del género Orthopoxvirus. De lo contrario, las vacunas deben liberarse en condiciones de emergencia, según lo determinado por las autoridades de seguridad y de salud pública nacionales. En circunstancias de esta emergencia, los riesgos de eventos adversos asociados con la vacuna serían compensados por los beneficios potenciales de la protección de las personas contra la viruela y de la sociedad contra la propagación de la enfermedad. Se reconoce que el uso de emergencia de las vacunas puede ser difícil de controlar, que los lactantes, que tienen un riesgo mayor de sufrir encefalitis posvacunal, recibirán las vacunas, y que pueden ignorarse las precauciones y contraindicaciones para su uso en personas con enfermedades subyacentes (por ejemplo, con antecedentes de eccema, embarazo e inmunosupresión). Por estas razones, es importante que las vacunas derivadas de cultivo celular de la invención no sean más virulentas que el producto actualmente autorizado.

Dependiendo de los eventos que no se pueden predecir con precisión, puede haber una decisión de realizar la profilaxis previa a la exposición de ciertos grupos, incluyendo personal militar, personal sanitario civil, y los denominados "primeros respondedores". El perfil de seguridad inherente de las vacunas en estos grupos, aunque de gran importancia, se ve potenciado por la aplicación deliberada del producto y la evitación del uso en individuos con factores de riesgo de acontecimientos adversos. En estas circunstancias, los riesgos principales son autoinoculación, viruela ocular e infección accidental, todos los cuales son acontecimientos adversos autolimitantes. Hay un pequeño riesgo de infección accidental de otras personas con factores de riesgo subyacentes.

Por supuesto, si las circunstancias en el país o del mundo cambian de tal manera que se cree que la vacunación de rutina de miembros adicionales de la población (por ejemplo, niños), o incluso de toda la población, es deseable, las vacunas de la presente invención pueden usarse para estos propósitos también.

Modos y cantidades de administración

Las vacunas de la invención se preparan mediante la propagación de una cepa deseada del virus variolovacunal (por ejemplo, cepa ACAM1000; depósito de la ATCC N° PTA-3321; véase más adelante) en un sistema de cultivo celular, y la purificación de la cepa cultivada del sistema utilizando el métodos estándar. Por ejemplo, la cepa puede cultivarse en células diploides de fibroblastos de pulmón humano, tales como células MRC-5, células de fibroblastos primarios de embrión de pollo, o cualquier otro tipo de célula apropiada, como puede determinar un experto en esta técnica. El cultivo puede realizarse usando cualquier sistema apropiado tal como, por ejemplo, el Nunc Cell Factory®.

El virus purificado se puede liofilizar para su uso posterior o se puede preparar de inmediato en una solución farmacéutica. Numerosas soluciones farmacéuticamente aceptables para su uso en la preparación de vacunas son bien conocidas en la técnica y pueden adaptarse fácilmente para su uso en la presente invención por un experto en esta técnica. (Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences (18ª edición), ed. A. Gennaro, 1.990, Mack Publishing Co., Easton, PA.) Sin embargo, los virus simplemente se pueden diluir en una solución fisiológicamente aceptable, tal como solución salina estéril o solución salina tamponada estéril, con o sin un adyuvante o vehículo.

Opcionalmente, la solución farmacéutica puede contener un componente que proporciona viscosidad (por ejemplo, glicerol) y / o un componente que tiene propiedades bactericidas (por ejemplo, fenol). Las vacunas se pueden almacenar a una concentración de 10^7 - 10^9 unidades formadoras de placas (UFP) / ml, por ejemplo, 10^8 UFP / ml.

5 Las vacunas de la invención pueden administrarse a los pacientes, por ejemplo, mediante escarificación, utilizando métodos estándar. En este abordaje, por ejemplo, se puede usar una aguja bifurcada. Como alternativa, la vacuna se puede administrar usando cualquier otra ruta estándar que un experto en la técnica consideró aceptable. Por ejemplo, la vacuna puede administrarse mediante inyección subcutánea o intradérmica, o por otra vía parenteral, tal como mediante inyección intramuscular. La cantidad de vacuna administrada a un adulto de tamaño medio puede ser, por ejemplo, 1×10^4 to 1×10^6 unidades formadoras de placas. Como ejemplo específico, se pueden utilizar $2,5 \times 10^5$ unidades formadoras de placas.

15 Preferentemente, la vacunación se lleva a cabo antes de cualquier exposición a la viruela, pero la vacunación también se puede llevar a cabo con pacientes que han estado expuestos a la viruela, Preferentemente en el plazo de unos pocos días desde la exposición. La vacunación puede llevarse a cabo solo una vez en la vida de una persona o puede repetirse después de un período de tiempo, tal como varios años (por ejemplo, 5 - 10 años), tal como determina que es apropiado un experto en esta técnica.

20 *Identificación de candidatos a vacuna*

También se describen en el presente documento métodos de identificación de candidatos a vacuna variolovacunal. Estas candidatos pueden identificarse mediante el aislamiento de cepas clonales de cultivos celulares inoculados con Dryvax®, y la caracterización de estos clones utilizando cualquiera de los métodos *in vitro* o *in vivo* descritos a continuación. Por ejemplo, una cepa de la vacuna candidata se puede comparar con Dryvax® según el tamaño de la placa, el rendimiento en el cultivo celular (usando, por ejemplo, células MRC-5), la virulencia cutánea en conejos, la neurovirulencia en ratón lactante, la neurovirulencia en monos o la protección de un modelo de exposición de ratón. Los candidatos preferidos son aquellos con virulencia que es similar o inferior a la de Dryvax®, que inducen inmunidad protectora que es similar o mayor que la de Dryvax®, y también tienen características de crecimiento que son similares o mayores que las de Dryvax®.

30 Antes de la presente invención, el aislamiento de una cepa clonal que tiene características satisfactorias de un candidato a vacuna era impredecible, debido a que la larga historia de pases de vacuna ha dado lugar a la generación de múltiples subpoblaciones de variantes (es decir, un enjambre genético), con propiedades biológicas potencialmente diferentes. También era incierto si una sola variante, aislada mediante purificación en placas (es decir, clonación biológica), tendría las mismas características fenotípicas que la suma de las múltiples variantes en la población de virus mixtos originales. De hecho, antes de la presente invención, habría sido sorprendente si este fuera el caso.

40 El desarrollo y la caracterización preclínica de las vacunas de la invención se describen adicionalmente, del siguiente modo.

Desarrollo y Caracterización preclínicos de vacunas variolovacunales

45 Como se ha mencionado anteriormente, Dryvax® es la vacuna variolovacunal que actualmente está autorizada por la FDA, derivó de la cepa del New York City Board of Health (NYCBH) y producida hasta 1982 por Wyeth-Lederle mediante el método de linfa de ternera bovina (véase también el depósito en la ATCC n° VR-325). Dryvax® consiste en un virus variolovacunal vivo, atenuado y no existe como un producto de cultivo celular. Los inventores adaptaron la cepa de la vacuna de la viruela del virus variolovacunal para la propagación en condiciones controladas en cultivos de crecimiento en laboratorio de células fibroblastos de pulmón humano de modo que las técnicas modernas pudieran usarse para la producción de vacunas. Para desarrollar una vacuna de cultivo celular, los inventores tuvieron que separar Dryvax® de potenciales contaminantes virales accidentales por el paso a la dilución terminal, y lo hicieron con y sin clonación, como se trata más adelante. De la mezcla de variantes (el enjambre genético) en Dryvax®, los inventores seleccionaron vacunas candidatas que tienen características biológicas similares en animales y similitud genómica a la vacuna autorizada, proporcionando un alto grado de certeza de que son tan eficaces clínicamente como el producto de linfa de ternero original.

60 En una estrategia usada para la adaptación, el virus variolovacunal se clonó para aislar el virus de posibles microorganismos contaminantes derivados de piel de ternera. A través del uso de esta estrategia, se aislaron seis clones. Los virus clonados exhibieron diversas características con mayor o menor virulencia en comparación con Dryvax®. Sorprendentemente, dada la mezcla esperada de variantes en Dryvax®, se encontró que tres clones eran similares a Dryvax® en las pruebas de virulencia en animales y diferían principalmente en la tasa de crecimiento en cultivo celular. Cualquiera de estas cepas, así como otras con características similares, se puede utilizar en métodos de vacunación contra la viruela, de acuerdo con la invención.

65 En otra estrategia, el virus no se clonó, con la expectativa de que el virus obtenido mediante este método sería más probable que se comportara como la cepa de la que se obtuvo. Sorprendentemente, no obstante, los inventores han

5 encontrado que la cepa producida sin la clonación, aunque se comporta de manera similar a Dryvax® en ensayos *in vitro*, no tienen las características de la cepa de la vacuna, pero, de hecho, era más virulenta cuando se analizó en animales de laboratorio. Por lo tanto, los inventores centraron sus esfuerzos de desarrollo en virus clonados con características similares a las de la cepa de la vacuna Dryvax®. Los detalles de su caracterización son los siguientes.

10 Dryvax® se inoculó en cultivos de células MRC-5 y seis clones del virus variolovacunal se obtuvieron mediante purificación en placa. Cada clon se volvió a clonar dos veces para asegurar la clonalidad y la ausencia de contaminantes. Dryvax® también se inoculó en cultivos de células MRC-5 a una multiplicidad de infección (MOI) de 0,001 UFP por célula para obtener una preparación de virus (policlonal) no clonado. Este virus se pasó posteriormente en células MRC-5 dos veces más a una MOI baja. Los seis clones y la preparación policlonal se analizaron en una extensa serie de análisis comparativos junto con Dryvax® para las características *in vitro* e *in vivo*. En particular, se analizaron cada clon y la preparación policlonal para la morfología de la placa, el rendimiento en las células MRC-5, los patrones de mapeo de las endonucleasas de restricción, la formación de pústulas cutáneas en conejos, y la neurovirulencia en ratones. Un subconjunto de clones se analizó adicionalmente para determinar la inducción de inmunidad protectora en ratones. El objetivo era seleccionar una cepa de la vacuna del conjunto Dryvax® con similitud biológica a Dryvax®. La Tabla 1 resume los resultados de estos estudios.

Tabla 1. Caracterización de 7 candidatos de virus variolovacunal

Prueba	Resultados (en relación con Dryvax® para ensayos cualitativos)							
	Dryvax [®]	Clon 1	Clon 2	Clon 3	Clon 4	Clon 5	Clon 6	Poli
Tamaño de la placa (media, mm)	0,42	0,43	0,49	0,36	0,65	0,25	0,27	0,46
Rendimiento en MRC-5 [†]	4,0	13,5	7,0	10,6	15,6	4,7	1,5	7,0
Análisis RE		Igual	Igual	Igual	Igual	Igual	Igual	Igual
Prueba cutánea en conejo		Alta	Igual	Alta	Igual	Alta	Igual	Alta
Neurovirulencia en ratón lactante		Alta	Igual	Alta	Igual	Alta	Igual	Alta
Inmunogenicidad en ratones		No analizada	Igual	Igual	Igual	No analizada	No analizada	No analizada
[†] ufp/ml x 10 ⁶								

20 A partir de estos estudios, se identificó que los clones 2 y 4 tenían características que muestran que estos clones son adecuados para su uso como una nueva vacuna contra la viruela. El clon 6 también tiene características adecuadas, pero no crece tan bien como los clones 2 y 4 en cultivo.

25 *Neurovirulencia en ratón lactante*

30 Se determinó que los ratones adultos eran insensibles a la inoculación intracraneal (IC) de Dryvax® sin modificar. Por lo tanto, se desarrolló una prueba en ratones lactantes. Se inyectó a ratones lactantes (3 - 4 días de edad) diluciones decimales de virus y el se determinó el tiempo de supervivencia. Se realizaron tres experimentos, en los que Dryvax® se usó en cada uno como patrón. Los inventores observaron que los ratones lactantes a los que se inoculó IC Dryvax® desarrollaron uniformemente encefalitis fatal con una DL₅₀ de ~1,0 log₁₀ UFP y un tiempo medio hasta la muerte de siete días. Por tanto, se determinó que esta prueba era útil para la comparación de la neurovirulencia de los candidatos a vacunas con Dryvax® parental. Los resultados de estos experimentos se resumen en la Tabla 2 y el número de ratones supervivientes y los tiempos medios de supervivencia hallados en este análisis se muestran en las Figs. 1A-1D.

Tabla 2. Neurovirulencia para ratones lactantes, candidatos a vacunas variolovacunales

Experimento	Virus	Parámetro			
		DL ₅₀ ¹	DL ₉₀ ¹	AST ²	(SD)
1	Dryvax®	1,68	3,03	7,78	(4,19)
	Policlonal	< 1,3	1,94	6,09	(1,14)
2	Clon 1	< 2,3	< 2,3	4,20	(1,03)
	Dryvax®	1,3	2,1	6,67	(0,71)
	Clon 2	1,55	2,25	6,80	(2,74)

Experimento	Virus	Parámetro			
		DL ₅₀ ¹	DL ₉₀ ¹	AST ²	(SD)
	Clon 3	< 1,3	< 1,3	5,00	(1,16)
	Clon 4	2,59	3,16	6,11	(1,36)
3	Dryvax®	2,4	4,15	8,64	(3,42)
	Clon 5	< 1,3	< 1,3	4,08	(1,08)
	Clon 6	1,57	2,47	7,73	(4,63)

¹ Dosis intracerebral letal al 50 % por 0,02 ml de inóculo en el día 10 después de la infección
¹ Dosis intracerebral letal al 90% por 0,02 ml de inóculo en el día 10 después de la infección
² Tiempo promedio de supervivencia, días (desviación estándar) a DL₅₀ -10 - 100

Se pueden realizar pruebas adicionales para analizar la virulencia de las vacunas candidatas. Por ejemplo, los inventores han desarrollado una prueba de virulencia cutánea en conejo. Esta prueba se desarrolló con éxito utilizando inoculación intradérmica de Dryvax® sin pasar, que produjo lesiones de viruela relacionadas con la dosis caracterizadas por eritema, induración y, en algunos casos, una lesión central. Como otro ejemplo, se puede utilizar una prueba de neurovirulencia en monos. En esta prueba, un candidato derivado de Dryvax® clonado se prueba contra Dryvax® mediante inoculación IC de dosis graduadas de virus.

Los inventores también han desarrollado un modelo de exposición en ratón para pruebas de protección. En este modelo, se utilizó la cepa WR variolovacunal para exponer a ratones de 6-8 semanas de edad por vía intranasal (IN). La DL₅₀ es ~4,5 log₁₀ UFP y el tiempo medio hasta la muerte es de 6 - 7 días después de la exposición. La prueba es suficientemente robusta para su uso en estudios preclínicos de protección con la nueva candidata a vacuna. También se pueden usar modelos similares utilizando otros ortopoxvirus, tales como virus de la viruela vacuna.

Se analizó la capacidad de Dryvax® y los clones 2 y 4 para inducir inmunidad protectora contra la exposición a WR variolovacunal en ratones se. El clon 3 también se analizó para determinar si un clon con mayor virulencia también induce una respuesta inmunitaria mayor. Ratones de cuatro semanas de edad fueron inmunizados con dosis graduadas de cada cepa de virus. El virus se inoculó en la piel mediante escarificación con una aguja bifurcada, que es el método utilizado para inocular Dryvax® en seres humanos. Tres semanas después de la inmunización, se expuso a los ratones a 6,5 log₁₀ UFP (100 DL₅₀) de WR variolovacunal por vía IN. Se determinó la tasa de supervivencia 14 días después de la exposición. Se observó protección respuesta a la dosis con todas las cepas de virus y todos los clones protegieron a los ratones al menos tan bien como Dryvax®. No hubo diferencias en la actividad protectora entre los clones. Los tiempos promedios de supervivencia a diferentes dosis inmunizantes se resumen en la Tabla 3 y las dosis protectoras del 50 % (DP₅₀) se muestran en la Tabla 4.

Tabla 3. Tiempo de supervivencia de los ratones inmunizados tras la exposición con 100 DL₅₀ de WR variolovacunal.

Dosis inmun. (log 10 ufp/ml)	Tiempo promedio de supervivencia (días)			
	Dryvax®	Clon 3	Clon 2	Clon 4
8	14,0	NT	14,0	NT
7	14,0	14,0	14,0	14,0
6	12,0	14,0	12,4	12,4
5	7,6	8,8	7,2	7,0
4	5,2	5,2	7,8	5,4
3	5,6	5,4	5,4	4,8
2	5,2	5,8	5,2	NT

Tabla 4. Dosis protección al 50 % de Dryvax® y vacunas candidatas

DP ₅₀ (log ₁₀ ufp)			
Dryvax®	Clon 3	Clon 2	Clon 4
5,5	5,2	5,4	5,5

Análisis de endonucleasas de restricción

El ADN de Dryvax® y cada vacuna candidata se purificó y se sometió a digestión con la endonucleasa de restricción HindIII por determinar si existen diferencias genéticas entre las cepas. No se detectaron diferencias, como se muestra en el análisis electroforético de ADN genómico digerido mostrado en la Fig. 2.

Selección de un sustrato celular

5 Se realizaron estudios de la replicación de Dryvax® y los rendimientos en células MRC-5 y células de fibroblastos primarios de embrión de pollo (CEF) y mostraron que los rendimientos eran menores en las células CEF que en MRC-5. Por tanto, las células MRC-5 se seleccionaron como sustrato para el desarrollo de vacunas. Los candidatos pueden analizarse en células CEF u otras células para comparar los rendimientos de vacunas.

10 También se compararon los medios de crecimiento para la expansión de células MRC-5, el medio Williams E, el medio mínimo esencial (MEM) y el medio MEM de Dulbecco dieron resultados equivalentes. Los medios de enriquecimiento adicional con suero bovino fetal (FBS), aminoácidos no esenciales, vitaminas, y piruvato de sodio no proporcionaron ventajas sobre el medio con FBS al 10% con respecto a la viabilidad o al crecimiento celular. La cinética de crecimiento de MRC-5 a la densidad de siembra de células apropiada fue adecuada. Se determinó que la densidad de siembra de células era de 2×10^4 células / cm^2 . El tiempo hasta la división se determinó que era de 3 - 15 días y se determinó que la duplicación/división de la población era 1 - 1,5. Se definió un método para producir bancos de células y para la expansión de células para el crecimiento de virus. Se mostró que los métodos tripsinización estándar eran adecuados para la disociación celular. Se demostró que un método alternativo utilizando pronasa bacteriana era útil y puede tener la ventaja de evitar los productos derivados de animales en la fabricación.

20 Otras realizaciones de la invención están presentes en las reivindicaciones siguientes.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición farmacéutica que comprende (i) una cepa clonal del virus variolovacunal atenuado que se aísla de células cultivadas en las que se ha cultivado Dryvax® o ACAM 1.000 (depósito ATCC N° PTA-3321), es capaz de inducir una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica contra el virus de la viruela en un ser humano y, cuando se administra a un ser humano en una cantidad eficaz para inducir una respuesta inmunitaria protectora o terapéutica contra el virus de la viruela en dicho ser humano, está aceptablemente atenuada en dicho ser humano; y (ii) un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable,
- 10 donde dicho virus variolovacunal tiene la misma virulencia que la cepa del virus variolovacunal ACAM1000 (N° de depósito en la ATCC PTA-3.321), donde dicho virus variolovacunal tiene la misma inmunogeneicidad que la cepa del virus variolovacunal ACAM1000 (N° de depósito en la ATCC PTA-3.321), y donde dicho virus variolovacunal tiene el mismo patrón de digestión que la cepa del virus variolovacunal ACAM1000 (N° de depósito en la ATCC PTA-3.321), cuando se digiere con la endonucleasa de restricción HindIII.
- 15 2. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, donde dicho virus variolovacunal se produce en las mismas cantidades o en mayores cantidades que Dryvax® cuando se inoculan en cultivos celulares.
- 20 3. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, donde dicho virus variolovacunal se produce en las mismas cantidades o en mayores cantidades que la cepa del virus variolovacunal ACAM1000 (n° de depósito en la ATCC PTA-3321) cuando se inoculan en cultivos celulares.
- 25 4. La composición farmacéutica de la reivindicación 1, donde dicho virus variolovacunal es ACAM1000 (n° depósito en la ATCC PTA-3321).
5. La composición farmacéutica de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes para su uso en la prevención o el tratamiento en un paciente de la infección por el virus de la viruela.
- 30 6. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, donde dicha composición farmacéutica es para la administración a dicho paciente por escarificación.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 5, donde dicha composición farmacéutica es para la administración a dicho paciente en una cantidad que varía de 1×10^4 a 1×10^6 unidades formadoras de placas.

35

Fig. 1A

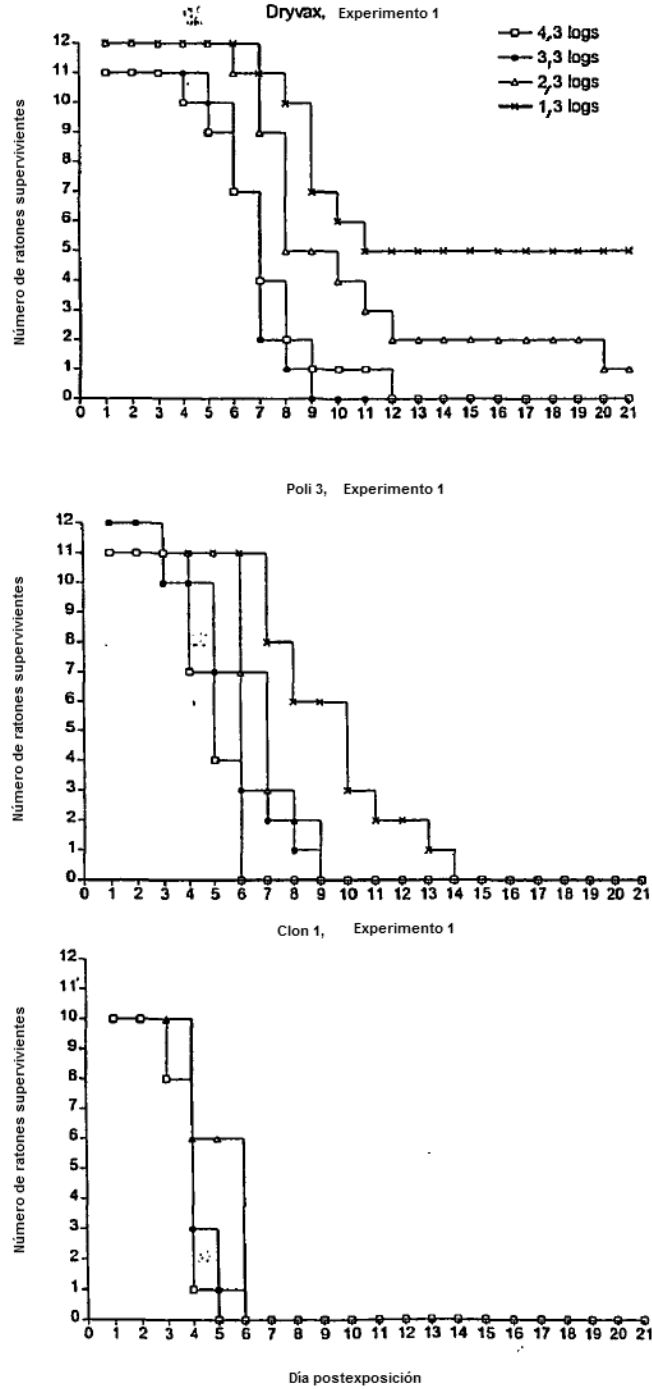


Fig. 1B

Experimento 2

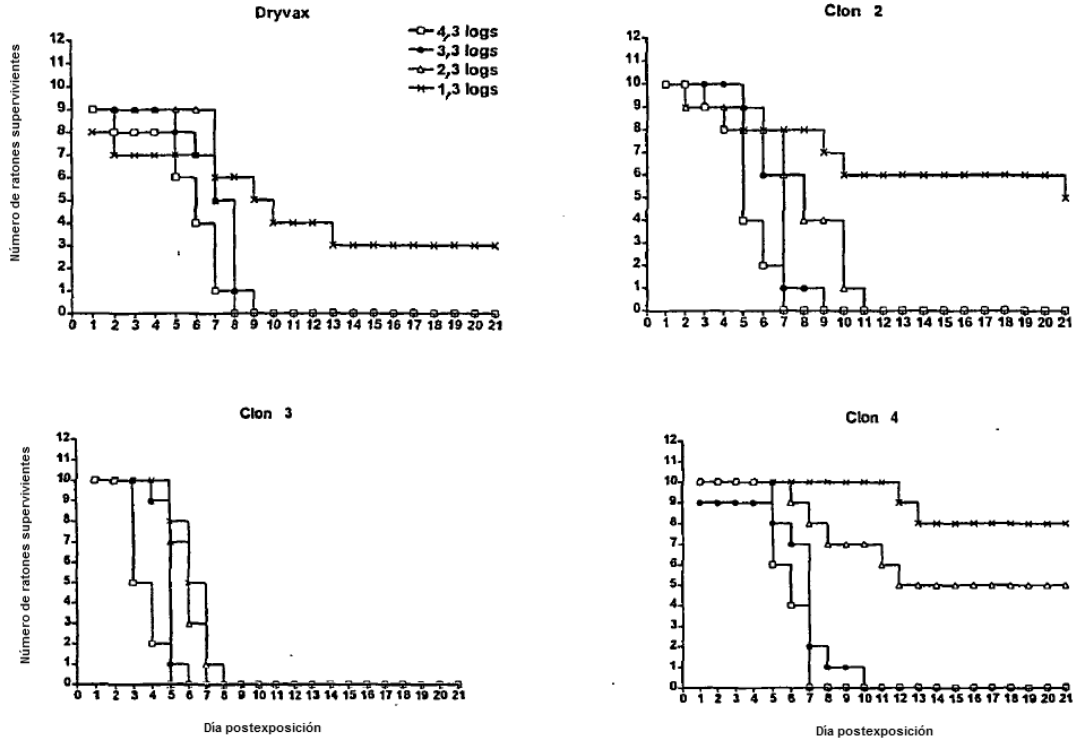
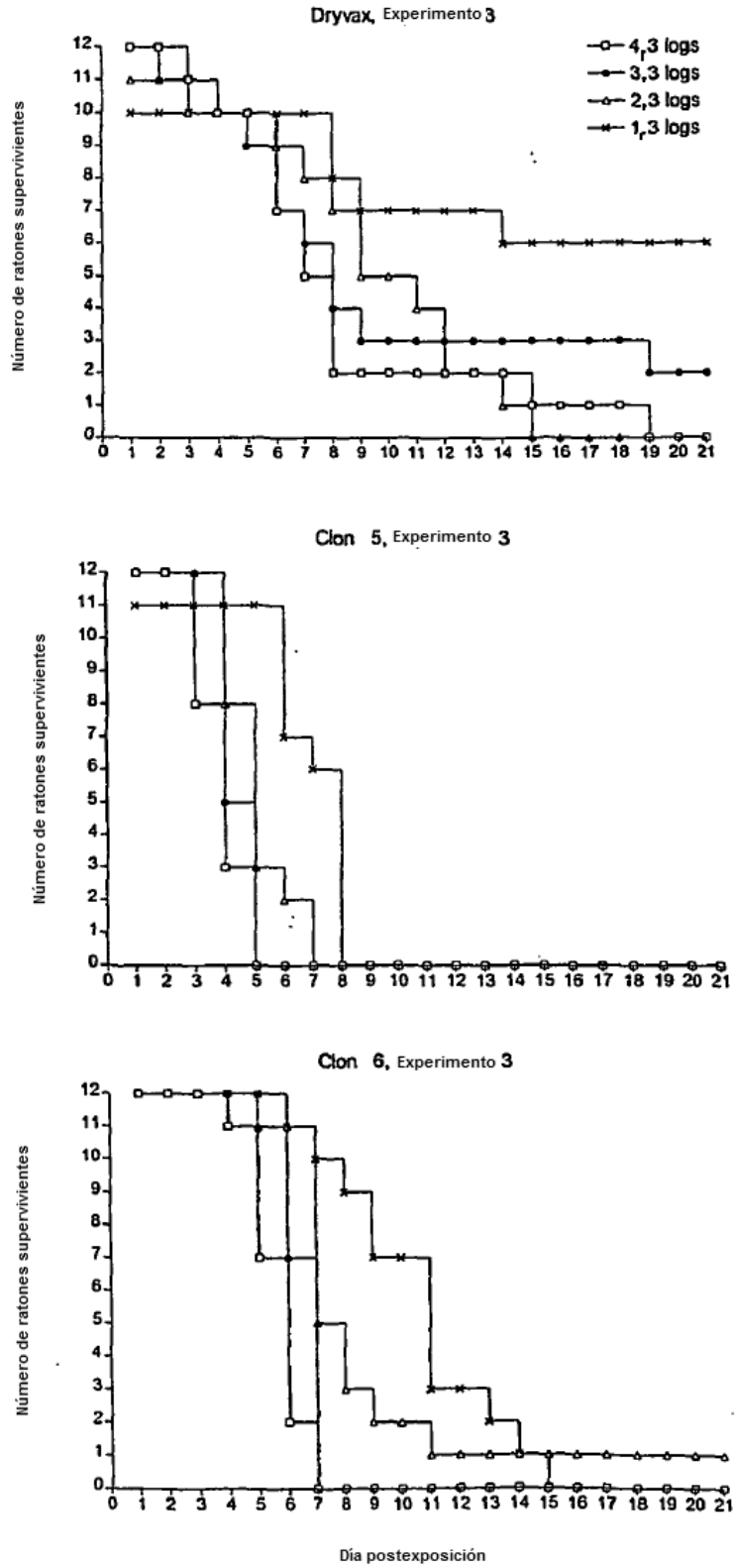


Fig. 1C



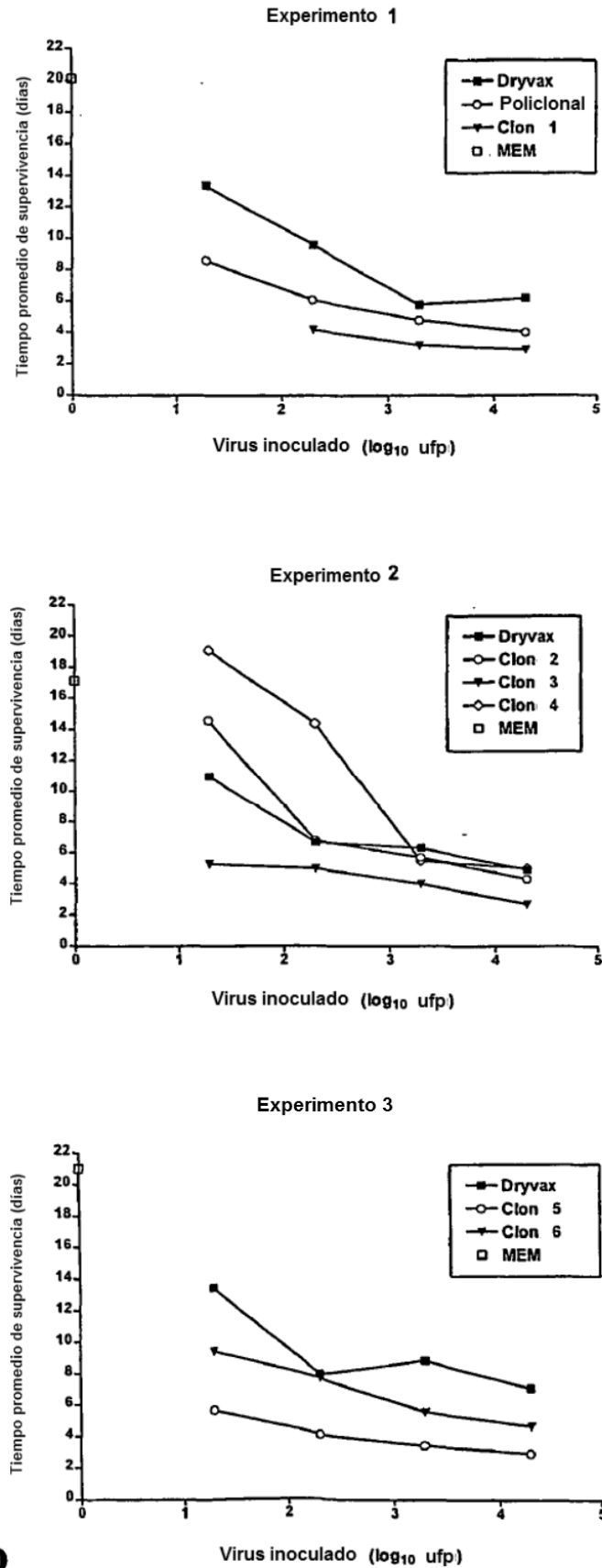


Fig. 1D

Fig. 2

