

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 619 936**

51 Int. Cl.:

A61K 47/26 (2006.01)

C12N 7/00 (2006.01)

A61K 9/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.11.2005 PCT/US2005/040149**

87 Fecha y número de publicación internacional: **18.05.2006 WO06052813**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.11.2005 E 05817250 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 1807511**

54 Título: **Formulaciones de virus envueltos estables y filtrables**

30 Prioridad:

05.11.2004 US 625349 P

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

27.06.2017

73 Titular/es:

**WELLSTAT BIOLOGICS CORPORATION (100.0%)
14200 Shady Grove Road Suite 600
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**CHEN, TZER-FEN;
JANG, JOUHN-WERN y
MILLER, JEFFREY, A.**

74 Agente/Representante:

SALVA FERRER, Joan

ES 2 619 936 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

Formulaciones de virus envueltos estables y filtrables

5 CAMPO DE LA INVENCION

[0001] La presente invención se refiere a la formulación de virus terapéuticos vivos y vacunas de virus vivos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

10

[0002] Solo se ha informado de ejemplos muy limitados para la estabilización de vacunas de virus viables líquidas congeladas a -20 °C. La mayoría de éstos no emplearon virus envueltos viables purificados (1, 2, 3, 4, 5). Uno de los mayores retos para estabilizar virus envuelto a temperaturas por debajo del punto de congelación es prevenir la rotura física de componentes estructurales y funcionales (es decir, proteínas, bicapa lipídica y genoma del virus) durante las etapas de congelación y almacenamiento. Se ha informado que las proteínas son susceptibles a la desnaturalización (6), y las bicapas lipídicas tienen tendencia a la rotura durante la congelación (7). Se ha informado de varios tipos de excipientes para estabilizar la estructura de la bicapa lipídica y proteínas durante la congelación y en el estado congelado (6, 7). Estos excipientes incluyen: polioles, sacáridos, tampones, aminoácidos y polímeros.

15

20 [0003] Las principales tareas para la estabilización de virus envueltos a temperaturas por debajo del punto de congelación son prevenir la rotura física de los componentes estructurales y funcionales durante tanto las etapas de congelación como de almacenamiento. Los componentes de los virus envueltos incluyen: 1) la membrana de envoltura de la bicapa lipídica; 2) las proteínas codificadas por el genoma viral, y 3) el genoma de ADN o ARN monocatenario o bicatenario.

25

[0004] Con el fin de garantizar la estabilidad durante el almacenamiento, disoluciones madre de virus infecciosos se han guardado comúnmente a temperatura ultra-baja (por ejemplo a ≤ -60 °C) debido a su complejidad. Gould, E.A. ("Methods for long-term Virus Preservation", Molecular Biotechnology Vol. 13, pp.57-66, 1999) enseñan que los virus envueltos con lípidos sobreviven bien a temperaturas ultra-bajas inferiores a -60 °C, pero que el almacenamiento a -20 °C debe solo usarse si "la retención de la infectividad del virus no es esencial". D.R. Harper describió las condiciones de almacenamiento para una amplia variedad de virus envueltos y no envueltos ("Virology, Ed. D.R. Harper, BIOS Scientific Publishers Limited, Oxford, UK, 1993). En todos los casos, los virus deben almacenarse a tanto -70 °C en forma líquida como a 4 °C como un liófilo con el fin de retener la infectividad. Las condiciones de almacenamiento para las formulaciones líquidas del virus de la enfermedad de Newcastle se mencionan específicamente como -70 °C.

30

35

[0005] Yannarell et al ("Stabilizing cold-adapted influenza virus vaccine under various storage conditions", J. Virol. Meth. Vol. 102, ppm.15-25, 2002) describen condiciones para el almacenamiento de vacuna del virus de la gripe adaptado al frío a -20 °C usando SPG, una mezcla de sacarosa, fosfato y glutamato (sacarosa 0,218 M, fosfato de potasio monobásico 0,0038 M, fosfato de potasio dibásico 0,0072 M, glutamato de potasio de 0,0049 M). El virus de la gripe preparado en líquido alantoideo para administración intranasal se diluyó al 10 % con una disolución 10X de SPG. La concentración final de sacarosa en esta mezcla fue del 7,5 %. La presencia de fosfato no ayuda a estabilizar NDV, mientras que el glutamato impide la esterilización por filtración y así ambos compuestos son perjudiciales para la preparación de NDV y el almacenamiento a -20 °C.

45

[0006] La administración parenteral añade una cuestión de formulación adicional. Por motivos de seguridad, los productos para uso parenteral deben esterilizarse por filtración a través de un filtro de 0,2 μm , ya que la esterilización terminal no es posible para preparaciones de virus viables. Los viriones de la enfermedad de Newcastle son partículas pleomórficas, pero aproximadamente esféricas, que oscilan en tamaño aproximado de 0,1 a 0,5 μm de diámetro. La tasa de recuperación de NDV filtrado a través de un filtro estéril de 0,2 μm es dependiente de la formulación y un factor importante a ser considerado para el desarrollo de una formulación de NDV líquida a -20 °C.

50

[0007] Los factores que afectan la capacidad de NDV para pasar a través de un filtro estéril de 0,2 μm incluyen el diámetro del virus, el tamaño de poro del filtro y la adsorptividad de NDV al filtro. El diámetro aparente de NDV puede ser afectado por: 1) La tonicidad de la formulación; y 2) la carga superficial de NDV, que puede afectar la configuración molecular y la adsorción de proteínas o ácido nucleico sobre la superficie de NDV en presencia de diferentes tampones.

55

[0008] La adsorción de NDV a la membrana de filtro también puede tener un efecto significativo sobre la capacidad del virus para ser esterilizado por filtración. Varios factores pueden tener un impacto sobre las propiedades superficiales de NDV y así afectar la adsorptividad de NDV al filtro. Estos factores incluyen: 1) pH, 2) fuerza iónica, 3) interacciones superficiales que incluyen interacciones hidrófobas o de van der Waals e interacciones iónicas y 4) la presencia de agentes tensioactivos tales como tensioactivos.

[0009] El documento US-B1-6 258 362 se refiere a composiciones farmacéuticas secadas estabilizadas dispersables en líquido acuoso o inyección.

10 **[0010]** El documento US-A-5 792 643 se refiere a métodos de preservación de un virus recombinante infeccioso para la posterior reconstitución.

[0011] El documento US-B1-6 290 967 se refiere a estabilizadores de vacuna, formulaciones de vacuna y vacunas liofilizadas con termoestabilidad potenciada.

15

[0012] Citas bibliográficas para los antecedentes:

1. Protocol "Methods for Long Term Virus Preservation", E.A. Gould, Molecular Biotechnology, Vol 13, 1999, pp 57-66.

20 2. T. Barrett, et al., "Growth, Purification and Titration of Influenza Viruses" in Virology: A practical Approach, Ed. B.W.J. Mahy; Raven Press Books, 1985, Ch. 6, pp. 119-146.

3. Virology Lab Fax: Ed. D.R. Harper; Bios Scientific Publishers Limited, 1993.

4. Lawrence D. Gelb, "Varicella-Zoster Virus" en Virology: Ed. B. N. Fields; Raven Press, 1985, Ch. 28, pp. 591-626.

25 5. Stabilizing cold-adapted influenza virus vaccine under various storage conditions: D. A. Yannarell et. al; Journal of Virological Methods; 102: 15-25, 2002.

6. Separation of Freezing- and Drying-induced denaturation of Lyophilized Proteins using Stress-Specific Stabilization, Prestrelski, et al., Archives of Biochemistry and Biophysics, Vol. 303, No. 2, June 1993, pp. 465-473.

7. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells, N. Guo et al., Nature Biotechnology, Vol. 18 Feb. 2000, pp. 168-171.

30

SUMARIO DE LA INVENCION

[0013] La presente invención proporciona un método de preservación de la estabilidad de un virus de la enfermedad de Newcastle que comprende mantener y/o guardar durante seis meses o más a una temperatura de -4 °C a -30 °C una disolución acuosa que comprende:

el virus de la enfermedad de Newcastle a una concentración de 10^6 UFP/ml a 10^{12} UFP/ml;

y sacarosa presente en la disolución a una concentración del 7,5 % (peso/volumen) al 15 % (peso/volumen);

40

en el que la disolución tiene una presión osmótica de 250 mOs o más alta; tiene un pH de 5 a 10; y contiene menos del 0,1 % (peso/volumen) de cloruro sódico, 10 partes por millón o menos de agentes reductores o antioxidantes, y menos de:

45 1 % (peso/volumen) de dextrano;

0,5 % (peso/volumen) de manitol;

0,1 % (peso/volumen) de sorbitol;

50

0,01 % (peso/volumen) de Tween;

0,01 % (peso/volumen) de glutamato;

55

0,5 % (peso/volumen) de polietilenglicol;

cloruro de calcio 0,1 mM;

0,5 % (peso/volumen) de fosfatidilcolina;

0,05 % (peso/volumen) de glicina; y 0,01 % (peso/volumen) de fosfato. En el presente documento se enseña un sacárido no reductor que es un disacárido y está presente en una disolución a una concentración del 5 % (peso/volumen) al 50 % (peso/volumen), y un monosacárido presente en una disolución a una concentración del 2,5 % (peso/volumen) al 25 % (peso/volumen). La disolución utilizada según la presente invención tiene una presión osmótica de aproximadamente 250 mOs o más alta, y tiene un pH de 5 a 10.

[0014] La presente invención se basa en el sorprendente hallazgo de que formular virus envueltos en una disolución acuosa que contiene un sacárido no reductor es una forma eficaz de lograr tanto la esterilización por filtración como la estabilidad a largo plazo a temperaturas moderadamente bajas.

DESCRIPCIÓN DE LA FIGURA

[0015] Figura 1: La capacidad de filtración de NDV en diferentes tampones.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0016] Como se usa en el presente documento, el término de transición "que comprende" es de extremos abiertos. Una reivindicación que utiliza este término puede contener elementos, además de aquellos citados en tal reivindicación. Así, por ejemplo, las reivindicaciones pueden leerse en pautas de tratamiento que también incluyen otros agentes terapéuticos o dosis de virus terapéuticos no específicamente citadas en su interior, en tanto que estén presentes los elementos citados o sus equivalentes.

[0017] Como se usa en el presente documento, "NDV" es una abreviatura para el virus de la enfermedad de Newcastle. Según la presente invención, el virus de la enfermedad de Newcastle puede ser de virulencia baja (lentogénico), moderada (mesogénico) o alta (velogénico). El nivel de virulencia se determina según la prueba del tiempo medio de muerte en huevos (MDT) (Alexander, "Chapter 27: Newcastle Disease" en Laboratory Manual for the Isolation and Identification of Avian Pathogens, 3rd ed., Purchase, et al. eds. (Kendall/Hunt, Iowa), página 117). Los virus se clasifican por la prueba de MDT como lentogénicos (MDT>90 horas); mesogénicos (MDT de 60-90 horas); y velogénicos (MDT<60 horas).

[0018] Como se usa en el presente documento, "sustancialmente ninguna" cantidad de un componente o impureza dado significa que el compuesto está presente en la disolución a una concentración de diez partes por millón o menos.

[0019] Dada la variabilidad inherente del ensayo de unidades formadoras de placa, un virus se considera "estable" durante un tiempo dado si se pierde menos del 50 % de la infectividad como se mide por el cambio en la cantidad de UFP/ml entre un momento de tiempo previo y un momento de tiempo posterior. El simplemente preservar la actividad enzimática de proteínas virales individuales, sin también preservar la infectividad, no se considera que sea la preservación de "estabilidad" en el sentido de la presente invención.

[0020] La presente invención utiliza una disolución acuosa, ya que el agua es esencial en mantener la estructura tridimensional y estabilidad de virus envueltos en la formulación líquida.

[0021] Disoluciones en las que el virus está demasiado diluido no son deseables debido a que el virus envuelto es menos estable, mientras que una concentración de virus alta no parece dañar la estabilidad durante el almacenamiento. En el proceso de congelación, el virus envuelto se concentrará en la región intersticial, en cuya condición el virus envuelto se considera que está en un estado altamente concentrado. Según la presente invención, la concentración de virus envuelto de 10^6 UFP/ml a 10^{12} UFP/ml, preferentemente de 1×10^{10} UFP/ml a 7×10^{10} UFP/ml.

[0022] Se enseña en el presente documento que cualquier virus envuelto puede formularse utilizando la disolución acuosa desvelada en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse paramixovirus tales como virus de la enfermedad de Newcastle. Actualmente se prefiere una cepa mesogénica del virus de la enfermedad de Newcastle.

[0023] Hay dos factores importantes a considerar para proteger virus envueltos de la inactivación a temperaturas moderadamente bajas (por ejemplo -20°C): isotonicidad en el estado líquido y prevención de la desnaturalización de las proteínas y la rotura de la membrana lipídica durante la congelación. Si la presión osmótica es mucho más baja que el punto isotónico, puede producir que explote la membrana viral. La alta presión osmótica

no parece afectar la estabilidad de virus envueltos durante el almacenamiento. Según la presente invención, es adecuada una presión osmótica de aproximadamente 250 mOs o más alta. Preferentemente, la presión osmótica es aproximadamente 300 mOs. Cuando la concentración de sacárido en la disolución está muy por debajo del 10 % (peso/volumen), puede ser necesario añadir otros excipientes para lograr una presión osmótica deseable.

5

[0024] El otro factor importante que puede afectar la estabilidad es la rotura de la estructura y componentes funcionales durante la congelación y almacenamiento. Sacáridos no reductores, especialmente disacáridos, son los más eficaces en proteger virus envueltos de la inactivación durante la congelación. Sin pretender limitarse por el mecanismo, se cree que la protección se produce previniendo la desnaturalización de la estructura tridimensional de proteínas y la rotura de la estructura de bicapa lipídica. También pueden usarse sacáridos no reductores para ajustar la presión osmótica en la formulación final. A diferencia, el sacárido reductor lactosa no mostró el mismo efecto estabilizante. Puede utilizarse cualquier sacárido no reductor en la disolución de la presente invención. Se enseñan en el presente documento disacáridos, presentes en una disolución a una concentración del 5 % (peso/volumen) al 50 % (peso/volumen). En una realización específica, el disacárido sacarosa está presente a una concentración del 7,5 % (peso/volumen) al 15 % (peso/volumen). En una realización preferida, el disacárido sacarosa está presente a una concentración del 10 % (peso/volumen) al 20 % (peso/volumen), más específicamente aproximadamente el 10 % (peso/volumen). Ejemplos de disacáridos adecuados incluyen sacarosa. Se enseñan en el presente documento monosacáridos, presentes en una disolución a una concentración del 2,5 % (peso/volumen) al 25 % (peso/volumen); preferentemente del 4 % (peso/volumen) al 7 % (peso/volumen), más preferentemente aproximadamente del 5 % (peso/volumen).

[0025] Según la presente invención, la disolución puede opcionalmente contener además lisina (son adecuadas L-lisina y D-lisina) o arginina a una concentración del 0,1 % (peso/volumen) al 5 % (peso/volumen) o lisina y arginina a una concentración combinada del 0,1 % (peso/volumen) al 5 % (peso/volumen). Preferentemente, la concentración de lisina y/o arginina es aproximadamente del 1 % (peso/volumen).

[0026] La estabilidad del virus está afectada por el pH. Según la presente invención, la disolución puede tener un pH de 5 a 10, preferentemente de 6,5 a 9, más preferentemente de 7 a 9, más específicamente aproximadamente 7,5.

30

[0027] Diversos compuestos tienen un efecto negativo sobre la estabilidad, capacidad de filtración, o ambos, y debe minimizarse su presencia en la disolución. Para la estabilidad óptima, la disolución según la presente invención no debe contener agentes sustancialmente reductores (por ejemplo, sacáridos reductores, cisteína) o antioxidantes (por ejemplo, EDTA, ácido ascórbico). Ciertos otros compuestos son menos perjudiciales y, por consiguiente, no necesitan ser excluidos completamente. Por ejemplo, es aceptable que la disolución utilizada según la presente invención contenga hasta el 0,1 % (peso/volumen) de cloruro sódico; 1 % (peso/volumen) de dextrano; 0,5 % (peso/volumen) de manitol; 0,1 % (peso/volumen) de sorbitol; 0,01 % (peso/volumen) de Tween; 0,01 % (peso/volumen) de glutamato; 0,5 % (peso/volumen) de polietilenglicol; cloruro de calcio 0,1 mM; 0,5 % (peso/volumen) de fosfatidilcolina; 0,05 % (peso/volumen) de glicina; y 0,01 % (peso/volumen) de fosfato. Sin embargo es preferible que la disolución no contenga sustancialmente cloruro sódico, dextrano, manitol, Tween, glutamato, polietilenglicol, cloruro de calcio, fosfatidilcolina, glicina y fosfato. La glicina, además de tampones negativamente cargados tales como tampones glutamato o fosfato, no es buena para la esterilización por filtración y recuperación.

[0028] Cuando la disolución va a administrarse por vía parenteral debe ser estéril. La estabilidad no es crucial para la administración tópica o por vía oral. Puede, y preferentemente debe, esterilizarse antes del almacenamiento a baja temperatura con un filtro esterilizante de calidad farmacéutica. El método preferido para la esterilización es la filtración por tamaño usando un filtro que tiene un tamaño más grande que el tamaño eficaz del virus envuelto pero más pequeño que las bacterias. Se prefiere un filtro estéril de 0,2 micrómetros. Normalmente, la viscosidad de la disolución aumenta con la concentración, que pueden hacer más difícil de filtrar el NDV. Para obtener una buena velocidad de recuperación de virus durante la esterilización por filtración, la presión debe preferentemente mantenerse en el intervalo de 10 a 15 psi. Con ajustes de alta viscosidad y baja presión, puede ser muy difícil filtrar virus envueltos. El problema con la alta viscosidad puede vencerse usando mezcla aséptica después de la esterilización por filtración del virus. Para evitar la alta viscosidad es preferible no usar altas concentraciones de excipientes. Por ejemplo, el dextrano, un polímero basado en glucosa, puede afectar la filtración y recuperación de virus durante la filtración final.

[0029] Aunque se creyó previamente que las formulaciones líquidas de virus envueltos eran estables solo a temperaturas ultra-bajas tales como -60 °C o -70 °C, sorprendentemente se ha encontrado que los virus envueltos

formulados según la presente invención son estables durante largos periodos de tiempo a -20 °C. Por ejemplo, los virus envueltos formulados como en la presente invención son estables a temperaturas de -4 °C a -30 °C, preferentemente -10 °C a -30 °C, más preferentemente de -15 °C a -25 °C, todavía más preferentemente a -20 °C. El almacenamiento a aproximadamente -20 °C es conveniente. La capacidad para mantener la estabilidad a -20 °C hará posible que un producto terapéutico sea tenido en existencias en hospitales y farmacias, que normalmente tienen congeladores a -20 °C, pero normalmente no tienen congeladores a -70 °C. Además, debido a que los cierres de recipientes tradicionales mantienen mejor flexibilidad a -20 °C que a -70 °C, se asegura el mantenimiento de la esterilidad y, por tanto, la seguridad del paciente por el almacenamiento a -20 °C. Utilizando el método de la presente invención, los virus envueltos son estables durante 6 meses, 12 meses, 24 meses o más.

[0030] La invención se entenderá mejor por referencia a los siguientes ejemplos, que ilustran, pero no limitan, la invención descrita en el presente documento. En los siguientes ejemplos, el NDV es una cepa MK107 purificada en placa triple, que es una versión atenuada (mesogénica) de la versión de virus de la enfermedad de Newcastle, descrita más completamente en la publicación de patente internacional WO 00/62735, publicada el 26 de octubre de 2000 (Pro-Virus, Inc.).

EJEMPLOS

[0031] ML se define como 5 % (peso/volumen) de manitol/1 % (peso/volumen) de lisina a pH 8,0

Ejemplo 1: Estabilidad de NDV en 5 % (peso/volumen) de manitol/1 % (peso/volumen) de disolución de lisina

[0032] Se derivó NDV de la cepa mesogénica del virus de la enfermedad de Newcastle Mass-MK107 por purificación en placa triple y se produjo por inoculación del virus en la cavidad de líquido alantoideo de huevos de pollo embrionados de 10 días de edad. Después de la incubación a 36 °C durante 2 días, los huevos se enfriaron y se recogió el líquido alantoideo. El líquido alantoideo recogido se diafiltró con 5 % (peso/volumen) de D-manitol y 1 % (peso/volumen) de L-lisina, tampón a pH 8,0 (ML), se clarificó y se purificó por filtración de flujo tangencial y cromatografía de exclusión por tamaño a una concentración de 1 a 4 E+10 UFP/ml, se separó en alícuotas y se guardó a -20 °C. El título de NDV se midió por ensayo en placa y se expresó como la cantidad de unidades formadoras de placa (PFU) de NDV infeccioso por mililitro. Para este ensayo, se sembraron células de fibrosarcoma HT1080 humano en placas de cultivo de tejido y se cultivaron a confluencia. Se eliminó el medio de crecimiento, se lavaron las monocapas de células con medio y se añadieron 0,5 ml de muestra de NDV. Las placas se incubaron balanceando durante 90 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂. Las monocapas se lavaron como se describe, y se recubrieron 3 ml de medio de agar semi-sólido sobre cada pocillo. Los cultivos se incubaron durante 48 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Las monocapas de células se tiñeron con rojo neutro, se contaron las placas y se determinaron los títulos de virus, UFP/ml. Los resultados (Tabla I) indicaron que el NDV guardado a -20 °C en 5 % de manitol/1 % de lisina no fue estable, perdiendo en promedio más del 80 % de actividad. La estabilidad se expresó como el porcentaje de título que queda con respecto al título a tiempo cero.

40 TABLA I: Estabilidad de NDV formulado en 5 % de D-manitol (peso/volumen) y 1 % de L-lisina (peso/volumen) a -20 °C

Lote N.º	% de actividad restante				
	4 Meses	8 Meses	12 Meses	18 Meses	24 Meses
1	26	NT*	17	NT	NT
2	18	15	9	NT	NT
3	11	6	0,3	0,9	1,4

*NT: No probado

Ejemplo 2: Estabilidad de NDV en 10 % (peso/volumen) de disolución de sacarosa

[0033] Se preparó NDV por el método descrito en el Ejemplo 1, se intercambió de tampón a una disolución al 10 % (peso/volumen) de sacarosa por filtración de flujo tangencial y cromatografía de exclusión por tamaño, se separó en alícuotas y se guardó a -20 °C. La estabilidad se midió por ensayo en placa como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados (Tabla II) indicaron que NDV guardado a -20 °C en 10 % (peso/volumen) de sacarosa fue estable durante hasta 24 meses.

TABLA II: Estabilidad de NDV en 10 % (peso/volumen) de formulación de sacarosa a -20 °C

Lote N.º	% de actividad restante				
	3 Meses	6 Meses	12 Meses	18 Meses	24 Meses
1	100	100	82	91	100
2	83	NT	96	NT	NT
3	79	93	72	NT	NT

*NT: No probado

Ejemplo 3: Estabilidad de NDV en 10 % (peso/volumen) de disolución de sacarosa que contiene otros excipientes

5

[0034] Se preparó NDV por el método descrito en el Ejemplo 1 y se intercambió de tampón a una disolución al 10 % (peso/volumen) de sacarosa por filtración de flujo tangencial y cromatografía de exclusión por tamaño. Se prepararon formulaciones separadas de NDV en 10 % (peso/volumen) de sacarosa que contenía un aminoácido mediante la adición de tanto L-lisina, L-glicina como ácido L-glutámico a una concentración final de 1 % (peso/volumen). Las formulaciones se separaron en alícuotas y se guardaron a -20 °C. La estabilidad se midió por ensayo en placa como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados (TABLA III) indicaron que NDV guardado a -20 °C en 10 % (peso/volumen) de sacarosa que contenía 1 % de lisina, 1 % de glicina o 1 % de ácido glutámico fue estable durante hasta 14 meses.

10

15

TABLA III: Estabilidad de NDV en 10 % (peso/volumen) de sacarosa que contiene aminoácidos a -20 °C

NDV/tampón	% de actividad restante	
	4 Meses	14 Meses
10 % de sacarosa/1 % (peso/volumen) de L-lisina (pH 6,5)	100 %	138 %
10 % de sacarosa/1 % (peso/volumen) de L-glicina (pH 6,5)	105 %	115 %
10 % de sacarosa/1 % (peso/volumen) de ácido L-glutámico (pH 7,9)	100 %	107 %

Ejemplo 4: Estabilidad de NDV en otras disoluciones de tampón

[0035] Se preparó NDV por el método descrito en el Ejemplo 1. Porciones de la muestra de NDV se intercambiaron de tampón a diferentes formulaciones que incluían: 5 % (peso/volumen) de manitol/1 % (peso/volumen) de L-lisina/2 % (peso/volumen) de hidrolizado de gelatina, 10 % (peso/volumen) de trehalosa/1 % (peso/volumen) de L-lisina, acetato sódico 200 mM en 5 % (peso/volumen) de manitol/1 % (peso/volumen) de lisina y 2 % de albúmina de suero humano (HSA) en 5 % (peso/volumen) de manitol/1 % (peso/volumen) de lisina, se separaron en alícuotas y se guardaron a -20 °C. La estabilidad se midió por ensayo en placa como se describe en el Ejemplo 1. La adición de 2 % (peso/volumen) de hidrolizado de gelatina a NDV preparado en 5 % (peso/volumen) de manitol/1 % (peso/volumen) de L-lisina mejoró significativamente la estabilidad en comparación con NDV preparado en la formulación de manitol/L-lisina (véase el Ejemplo 1), mientras que la adición de 2 % de HSA proporcionó un nivel más modesto de protección.

20

30

TABLA IV: Estabilidad de la formulación de NDV en tampones que contienen hidrolizado de gelatina, HSA, acetato de Na y trehalosa a -20 °C

NDV/Tampón	% de actividad restante				
	4 Meses	8 Meses	12 Meses	18 Meses	24 Meses
2 % de hidrolizado de gelatina ML	78	71	64	66	80
10 % de trehalosa/1 % de lisina	35	NT	29	NT	NT
Acetato sódico 200 mM ML	67	52	37	NT	NT
2 % de HSA/ML	65 %	70 %	51 %	43 %	NT

Ejemplo 5: Estabilidad de NDV en tampones dextrano a -20 °C

[0036] Se preparó NDV por el método descrito en el Ejemplo 1. Se intercambiaron de tampón porciones de la muestra de NDV a diferentes formulaciones que incluían: 0,9 % (peso/volumen) de NaCl/5 % (peso/volumen) de dextrano y 10 % (peso/volumen) de trehalosa/20 % (peso/volumen) de dextrano. Se encontró que el dextrano proporcionaba un nivel moderado de protección a NDV (Tabla V) cuando NDV se almacenó a -20 °C.

35

TABLA V: Estabilidad de NDV en tampones dextrano a -20 °C

Formulación	% de actividad restante				
	3 Meses	6 Meses	9 Meses	12 Meses	18 Meses
NDV 0,9 % de NaCl/5 % de dextrano	61 %	55 %	52 %	NA	22 %
NDV 10 % de trehalosa/ 20 % de dextrano (70K)	64 %	61 %	50 %	26 %	17 %

Ejemplo 6: Estabilidad de NDV en otras disoluciones de tampón

5 **[0037]** Se purificó NDV por el método descrito en el Ejemplo 1, se intercambió de tampón a diferentes tampones (véanse el Ejemplo 4 y 5), se separó en alícuotas y se guardó a -20 °C. La estabilidad se midió por ensayo en placa como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados (Tabla VI) indicaron que NDV preparado en estos tampones descritos en la Tabla VI no fue estable cuando se guardó a -20 °C:

10 El resto de esta página se ha dejado intencionadamente en blanco.

TABLA VI: NDV en tampones que muestran mala estabilidad a -20 °C

Formulación	% de actividad restante		
	4 M	8 M	12 M
5 % (peso/volumen) de manitol/1 % (peso/volumen) de L-Lisina	18 %	15 %	9 %
0,1 % (peso/volumen) de Tween/ML	<1 %	NT	NT
10 % (peso/volumen) de disolución de lactosa	<1 %	NT	NT
2 % (peso/volumen) de gelatina/5 % (peso/volumen) de manitol/ 1 % (peso/volumen) de lisina	13 %	NT	NT
1 % (peso/volumen) de arginina / 5 % (peso/volumen) de disolución de manitol	2,3 %	NT	NT
1 % (peso/volumen) de ácido glutámico/5 % (peso/volumen) de manitol	<1 %	NT	NT
5 % (peso/volumen) PEG/5 % (peso/volumen) de manitol/ 1 % (peso/volumen) de lisina	3,7 %	NT	NT
CaCl ₂ 10 mM /ML	6 %	NT	NT
5 % de fosfatidilcolina/ ML	14 %	NT	NT
1 % de glicina/5 % (peso/volumen) de manitol	5 %	NT	NT
0,05 % de EDTA/5 % (peso/volumen) de manitol/ 1 % (peso/volumen) de lisina	31 %	17 %	NA
*NT: No probado			

Ejemplo 7: Esterilización por filtración de NDV preparado en manitol

15 **[0038]** Se preparó NDV en 5 % (peso/volumen) de manitol/1 % (peso/volumen) de lisina como se describe en el Ejemplo 1. Se dializó una porción (cómo) en 5 % (peso/volumen) de manitol. Se añadió dextrano a otra porción de NDV ML para preparar una muestra de NDV en ML que contenía 10 % (peso/volumen) de dextrano. Estas muestras se probaron para su capacidad para someterse a esterilización por filtración pasando aproximadamente 30 ml de cada muestra secuencialmente a través de un prefiltro Sartobran™ de 0,45 um y un filtro Sartobran™ de 0,22 um
 20 bajo 15 psi. Los filtros se humedecieron previamente con tampón ML. Los filtrantes de cada muestra se recogieron y se analizaron por ensayo en placa para la cantidad total de actividad de placas virales recuperada (UFP) como se describe en el Ejemplo 1. NDV preparado en tampón ML o en 5 % (peso/volumen) de manitol se filtró fácilmente, mientras que NDV preparado en tampón ML que contenía 10 % (peso/volumen) de dextrano no pasó a través del
 25 filtro apreciablemente (Tabla VII).

TABLA VII: Resumen de los estudios de filtración para NDV que contiene manitol/lisina/dextrano

Formulación	Recuperación total (carga en porcentaje, normalizada)
ML	82 ± 17
5 % (peso/volumen) de manitol	83 ± 17
10 % (peso/volumen) de dextrano/5 % (peso/volumen) de manitol/1 % (peso/volumen) de lisina	4 ± 3

Ejemplo 8: Esterilización por filtración de NDV en tampón manitol que contiene lisina/fosfato/NaCl

[0039] Se preparó NDV como se describe en el Ejemplo 1, se intercambié a los tampones descritos en la Figura 1 y se probó para su capacidad para someterse a esterilización por filtración como se describe en el Ejemplo 7. Los filtros se humedecieron previamente con el tampón usado en la formulación. Para cada formulación, se recogió el volumen de tampón de NDV que pasó a través del filtro y se calculó el volumen acumulado. El NDV preparado en 5 % (peso/volumen) de manitol/1 % (peso/volumen) de lisina se filtró bien. El NDV preparado en 324 mOs de NaCl se filtró algo, pero NDV no se esterilizó por filtración bien cuando se preparó en 5 % (peso/volumen) de manitol que contenía 1 % (peso/volumen) de L-lisina, fosfato 20 mm o 5 % (peso/volumen) de manitol/1 % (peso/volumen) de lisina que contenía 0,9 % de NaCl o fosfato 20 mM.

Ejemplo 9: Esterilización por filtración de NDV preparado en tampón que contiene 10 % (peso/volumen) de sacarosa o 10 % (peso/volumen) de trehalosa

[0040] Se prepararon muestras de NDV como se describe en el Ejemplo 1 y se diafiltraron en 10 % (peso/volumen) de sacarosa o 10 % (peso/volumen) de trehalosa. A partir de estas disoluciones se prepararon muestras adicionales de NDV que contenían 10 % (peso/volumen) de sacarosa / 1 % de L-lisina, 10 % (peso/volumen) de sacarosa / 1 % de L-lisina / 10 % (peso/volumen) de dextrano y 10 % (peso/volumen) de trehalosa / 1 % de L-lisina mediante la adición de los componentes respectivos. Las muestras se probaron para su capacidad para someterse a esterilización por filtración como se describe en el Ejemplo 6. NDV preparado en 10 % (peso/volumen) de sacarosa, 10 % (peso/volumen) de sacarosa / 1 % (peso/volumen) de L-lisina o 10 % (peso/volumen) de trehalosa se esterilizó por filtración con una tasa de recuperación muy buena. NDV preparado en 10 % (peso/volumen) de trehalosa / 1 % (peso/volumen) de L-lisina se filtró con una tasa de recuperación razonable, mientras que NDV preparado en 10 % (peso/volumen) de sacarosa / 1 % (peso/volumen) de L-lisina / 10 % (peso/volumen) de dextrano se esterilizó mal por filtración (Tabla VIII).

TABLA VIII: Resumen de estudios de filtración para NDV que contiene sacarosa/trehalosa/lisina/dextrano

Formulación	Recuperación total (porcentaje de carga, normalizado)
10 % de sacarosa	69 ± 7
10 % de sacarosa/1 % de lisina	83 ± 3
10 % de trehalosa	74 ± 3
10 % de trehalosa/1 % de lisina	60 ± 7
10 % de dextrano/10 % de sacarosa/1 % de lisina	11 ± 1

Ejemplo 10: Esterilización por filtración de NDV preparado en 10 % de sacarosa que contiene 1 % de L-lisina, 1 % L-glutamato o 1 % de L-glicina

[0041] Se prepararon muestras de NDV como se describe en el Ejemplo 1 y se diafiltraron en 10 % (peso/volumen) de sacarosa. Este material se separó en cuatro porciones. Se añadió L-lisina, L-glutamato o L-glicina a cada una de las tres de estas porciones para producir muestras que contenían 10 % (peso/volumen) de sacarosa y 1 % (peso/volumen) de L-lisina, L-glutamato o L-glicina. Estas muestras se probaron para su capacidad para someterse a esterilización por filtración como se describe en el Ejemplo 6. NDV preparado en 10 % (peso/volumen) de sacarosa o 10 % (peso/volumen) de sacarosa que contenía 1 % de L-lisina se filtró fácilmente mientras que NDV preparado en 10 % (peso/volumen) de sacarosa que contenía 1 % (peso/volumen) de L-glutamato o glicina se filtró marginalmente (Tabla IX).

TABLA IX: Resumen de estudios de filtración para NDV que contiene sacarosa/lisina/ácido glutámico/glicina

Formulación	Recuperación total (porcentaje de carga, normalizado)
10 % de sacarosa	66 ± 11
10 % de sacarosa/1 % de lisina	55 ± 16
10 % de sacarosa/1 % de ácido glutámico	35 ± 5
10 % de sacarosa/1 % de glicina	25 ± 1

Ejemplo 11: Estabilidad de NDV en 10 % de sacarosa/lisina a diferentes pH

[0042] Se preparó NDV por los métodos descritos en el Ejemplo 1 y se intercambié de tampón a 10 % (peso/volumen) de sacarosa. Se prepararon muestras de prueba de NDV/10 % de disolución de sacarosa a

diferentes pH añadiendo tampón sacarosa/lisina de pH ajustado (diferentes pH) y se guardaron a -20 °C. Se probó la estabilidad de las muestras por ensayo en placa como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados indicaron que NDV/10 % de disolución de sacarosa es más estable en el intervalo de pH 7,3 a pH 8,8 que a pH más bajo.

TABLA X: Estabilidad de NDV formulado en 10 % de sacarosa (peso/volumen)/1 % de lisina (peso/volumen) a diferentes pH a -20 °C

5

Formulación (0-fecha: 22/10/05)	% de actividad restante			
	6 Meses	6 Meses	9 Meses	12 Meses
NDV 10 % de control de sacarosa (pH 5,7)	41 %	26 %	35 %	29 %
NDV Sac/1 % de lisina pH 5,3	50 %	38 %	28 %	42 %
NDV Sac/1 % de lisina pH 5,7	68 %	71 %	52 %	39 %
NDV Sac/1 % de lisina pH 6,3	109 %	58 %	52 %	52 %
NDV Sac/1 % de lisina pH 6,6	49 %	49 %	51 %	35 %
NDV Sac/1 % de lisina pH 7,3	72 %	85 %	64 %	62 %
NDV Sac/1 % de lisina pH 8,3	89 %	68 %	74 %	58 %
NDV Sac/1 % de lisina pH 8,8	69 %	64 %	TNTC	64 %
TNTC: Demasiado numerosa como para contarla				

Ejemplo 12: Estabilidad de NDV en diferentes concentraciones de sacarosa

[0043] Se preparó NDV por los métodos descritos en el Ejemplo 1 y se intercambié de tampón a 10 % (peso/volumen) de sacarosa. Se prepararon muestras de prueba de NDV a diferente concentración de disolución de sacarosa añadiendo diferente sacarosa concentrada o añadiendo agua para inyección y se guardaron a -20 °C. Los títulos finales de cada formulación se ajustaron a aproximadamente 2E10. Se probó la estabilidad de las muestras por ensayo en placa como se describe en el Ejemplo 1. Los resultados indican que el virus preparado en 10 al 20 % (peso/volumen) de sacarosa fue más estable que el virus preparado en concentraciones de sacarosa más bajas.

10

15

TABLA XI: Efecto de la concentración de sacarosa sobre la estabilidad de NDV a -20 °C

Formulación	% de actividad restante	
	6 Meses	9 Meses
NDV 2,5 % (peso/volumen) de sacarosa	63 %	51 %
NDV 5,0 % (peso/volumen) de sacarosa	67 %	76 %
NDV 7,5 % (peso/volumen) de sacarosa	60 %	55 %
NDV 10 % (peso/volumen) de sacarosa	100 %	84 %
NDV 15 % (peso/volumen) de sacarosa	81 %	71 %
NDV 20 % (peso/volumen) de sacarosa	89 %	83 %

REIVINDICACIONES

1. Un método de preservación de la estabilidad de un virus de la enfermedad de Newcastle que comprenden mantener y/o guardar durante seis meses o más a una temperatura de -4 °C a -30 °C una disolución acuosa que comprende:
- el virus de la enfermedad de Newcastle a una concentración de 10^6 UFP/ml a 10^{12} UFP/ml; y sacarosa presente en la disolución a una concentración del 7,5 % (peso/volumen) al 15 % (peso/volumen); en el que la disolución tiene una presión osmótica de 250 mOs o más alta; tiene un pH de 5 a 10; y contiene menos del 0,1 % (peso/volumen) de cloruro sódico, 10 partes por millón o menos de agentes reductores o antioxidantes, y menos de:
- 1 % (peso/volumen) de dextrano;
0,5 % (peso/volumen) de manitol;
0,1 % (peso/volumen) de sorbitol;
0,01 % (peso/volumen) de Tween;
0,01 % (peso/volumen) de glutamato;
0,5 % (peso/volumen) de polietilenglicol;
cloruro de calcio 0,1 mM;
0,5 % (peso/volumen) de fosfatidilcolina;
0,05 % (peso/volumen) de glicina; y 0,01 % (peso/volumen) de fosfato.
2. El método de la reivindicación 1, en el que la disolución comprende además lisina a una concentración del 0,1 % (peso/volumen) al 5 % (peso/volumen).
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en el que la disolución contiene 10 partes por millón o menos de cada uno de cloruro sódico, dextrano, manitol, sorbitol, Tween, glutamato, polietilenglicol, cloruro de calcio, fosfatidilcolina, glicina y fosfato.
4. El método de la reivindicación 2, en el que la concentración de lisina es 1 % (peso/volumen).
5. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el virus es una cepa mesogénica del virus de la enfermedad de Newcastle.
6. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la concentración de virus es de 1×10^{10} UFP/ml a 7×10^{10} UFP/ml.
7. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la concentración de sacarosa es del 10 % (peso/volumen) al 20 % (peso/volumen).
8. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la presión osmótica es 300 mOs.
9. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que el pH es de 7 a 9.
10. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la disolución es estéril.
11. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la temperatura de almacenamiento es de -30 °C a -10 °C.
12. El método de la reivindicación 11, en el que la temperatura de almacenamiento es -20 °C.
13. El método de cualquier reivindicación precedente, en el que la disolución se mantiene a la temperatura durante 12 meses o más, o durante 24 meses o más.

FIGURA 1

