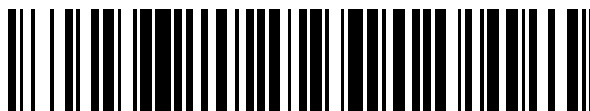


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 621 511**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 7/02 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.04.2008 PCT/US2008/059472**

87 Fecha y número de publicación internacional: **29.01.2009 WO09014774**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.04.2008 E 08826570 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.01.2017 EP 2144998**

54 Título: **Métodos y composiciones para virus vivos atenuados**

30 Prioridad:

06.04.2007 US 910579 P

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

04.07.2017

73 Titular/es:

**TAKEDA VACCINES, INC. (100.0%)
One Takeda Parkway
Deerfield, IL 60015 , US**

72 Inventor/es:

**STINCHCOMB, DAN T.;
OSORIO, JORGE E. y
WIGGAN, O'NEIL**

74 Agente/Representante:

DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto

ES 2 621 511 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

Métodos y composiciones para virus vivos atenuados

Prioridad

5 Esta solicitud reivindica el beneficio de prioridad de la solicitud provisional de patente de los Estados Unidos núm. 60/910,579, presentada el 6 de abril de 2007.

Campo

La presente invención se refiere a una composición de virus vivos atenuados, un método para disminuir la inactivación de una composición de virus vivos atenuados, y un kit para disminuir la inactivación de una composición de virus vivos, atenuados.

10 **Antecedentes**

15 Las vacunas para proteger contra infecciones virales se han usado efectivamente para reducir la incidencia de enfermedad humana. Una de las tecnologías más exitosas para las vacunas virales consiste en inmunizar animales o humanos con una cepa, debilitada o atenuada del virus (un "virus vivo, atenuado"). Debido a la limitada replicación suficiente para expresar la totalidad del repertorio de antígenos virales y generar respuestas inmunes poderosas y duraderas contra el virus. En consecuencia, luego de la posterior exposición a una cepa patogénica del virus, el individuo inmunizado está protegido contra la enfermedad. Estas vacunas de virus vivos, atenuados se encuentran entre las vacunas más exitosas de las usadas en la salud pública.

20 Diez de las dieciséis vacunas virales aprobadas para la venta en los Estados Unidos son virus vivos, atenuados. Las vacunas de virus vivos altamente exitosas incluyen el virus 17D de la fiebre amarilla, la vacuna Sabin contra el virus de la poliomielitis tipos 1, 2 y 3, los virus de sarampión, paperas, rubéola, varicela y vacuna. El uso de la vacuna contra el virus vacuna para controlar brotes de viruela condujo a la primera y única erradicación de una enfermedad humana. La vacuna Sabin del virus de la poliomielitis ha contribuido a prevenir una enfermedad incapacitante en todo el mundo y se utiliza en los esfuerzos para erradicar la poliomielitis. La vacunación infantil con vacunas contra sarampión, paperas, rubéola y varicela previene millones de muertes y enfermedades a nivel internacional.

25 Recientes avances técnicos tales como reorganización, genética inversa y adaptación al frío, han conducido al otorgamiento de licencias de virus vivos, atenuados para gripe y rotavirus. Numerosas vacunas de virus vivos, desarrolladas por tecnologías de ADN recombinante se encuentran en etapa de prueba clínica en humanos, las cuales incluyen las vacunas para la enfermedad del Nilo Occidental, la fiebre del dengue, el paludismo, la tuberculosis y el HIV. Estas vacunas de virus recombinantes dependen de la manipulación de vacunas de virus atenuados bien definidos, tales como adenovirus, virus vacuna, virus 17D de la fiebre amarilla o el virus del dengue, DEN-2 PDK-53. Los virus atenuados seguros, se modifican por ingeniería genética para expresar antígenos protectores contra otros patógenos virales o bacterianos. Se han aprobado varias vacunas de virus recombinantes para uso en animales, las cuales incluyen un virus recombinante de viruela de canario/leucemia felina, un virus recombinante de viruela de canario/moquillo canino, un virus recombinante de viruela de canario/Nilo Occidental y un virus recombinante de la fiebre amarilla/Nilo Occidental. Como grupo, las vacunas de virus vivos atenuados se encuentran entre las intervenciones médicas más exitosas en la historia de la humanidad, sólo segundas al advenimiento de los antibióticos y mantienen la promesa de mejorar la salud pública en todo el mundo.

30 Para que las vacunas de virus vivos, atenuados sean efectivas, deben tener capacidad de replicación después de la inmunización. En consecuencia, cualquier factor que inactive el virus puede incapacitar la vacuna. Por ejemplo, la amplia distribución y uso de la vacuna contra la viruela antes de la segunda guerra mundial era limitada porque el virus se inactivaba después de sólo unos pocos días a temperatura ambiente. En la década de 1920, científicos franceses demostraron que el secado por congelación de la vacuna proporcionaba estabilidad a largo plazo y se desarrollaron técnicas para la fabricación a gran escala de la vacuna secada por congelación en la década de 1940 (ver por ejemplo Collier 1955). Además del secado por congelación, se han detectado varios aditivos que pueden contribuir a estabilizar los virus en las vacunas de virus vivos, atenuados (ver por ejemplo Burke, Hsu y otros 1999). Estos estabilizantes generalmente incluyen uno o más de los siguientes componentes: cationes divalentes, soluciones salinas amortiguadas, quelantes, urea, azúcares (por ejemplo sacarosa, lactosa, trehalosa), polioles (por ejemplo, glicerol, manitol, sorbitol, polietilenglicol), aminoácidos, hidrolizados de proteínas (por ejemplo hidrolizado de caseína, hidrolizado de lactoalbúmina, peptona), proteínas (por ejemplo gelatina, albúmina sérica humana) o polímeros (por ejemplo dextrano).

35 Sin embargo, incluso con estos agentes estabilizantes, muchas de las vacunas comúnmente usadas aún requieren refrigeración para su estabilización. Otras vacunas comúnmente usadas son sensibles a temperaturas extremas; tanto el calor excesivo como la congelación accidental pueden inactivar la vacuna. El mantenimiento de esta "cadena de frío" durante la distribución es particularmente difícil en los países en desarrollo. En consecuencia, se mantiene la necesidad de mejorar la estabilidad de las vacunas de virus vivos, atenuados tanto existentes como recién desarrolladas.

Los flavivirus se encuentran entre los virus más lábiles. Son virus con envoltura que tienen genoma de ARN de aproximadamente 11 000 bases. La mayoría de los flavivirus son transmitidos por un vector artrópodo, comúnmente mosquitos. Existen más de 70 flavivirus diferentes que se agrupan en tres categorías principales en base a su serología: el grupo del dengue, el grupo de la encefalitis japonesa y el grupo de la fiebre amarilla. Entre los flavivirus conocidos, 40 son transmitidos por mosquitos, 16 son transmitidos por garrapatas y 18 virus no tienen insecto vector identificado. En consecuencia, la mayoría de los flavivirus han evolucionado para replicarse tanto en su artrópodo vector como en sus especies de vertebrados huésped (a menudo aves o mamíferos). La urbanización en expansión, los viajes por todo el mundo y los cambios ambientales (tales como la deforestación o los patrones de lluvia) han conducido a la emergencia de diversos flavivirus como amenazas a la salud pública humana. Dichos virus incluyen, sin limitaciones, virus de la fiebre amarilla, virus del dengue, virus del Nilo Occidental, virus de la encefalitis japonesa, y virus de la encefalitis transmitida por garrapatas.

Mediante el control intensivo de mosquitos y los esfuerzos de vacunación, la fiebre amarilla se eliminó de gran parte de América del Norte, Central y del Sur, el Caribe y Europa. Sin embargo, en los últimos 20 años, ha aumentado la cantidad de países que informan casos. El virus de la fiebre amarilla ahora es endémico en importantes porciones de África y América del Sur y algunas islas del Caribe. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que ocurren 200 000 casos anuales de la fiebre amarilla que conducen a 30 000 muertes. Desde la segunda guerra mundial, los flavivirus del dengue se han diseminado a las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo y ahora amenazan a más de 3,5 mil millones de personas, aproximadamente la mitad de la población mundial. La OMS estima que ocurren 50-100 millones de casos de fiebre del dengue al año. 500 000 de ellos pertenecen a la forma más severa de la enfermedad, que pone en peligro la vida, denominada fiebre del dengue hemorrágico, que causa más de 25 000 muertes por año. Una forma particularmente virulenta del virus del Nilo Occidental se introdujo en el hemisferio occidental, presuntamente por viajeros, en Nueva York en 1999. El virus transmitido por mosquitos infectó aves como huésped primario, pero también causó enfermedad y mortalidad en humanos y caballos. El virus del Nilo Occidental se diseminó por los Estados Unidos, Canadá y México. Desde su introducción, el virus del Nilo Occidental ha causado más de 20 000 casos informados de enfermedad del Nilo Occidental que causaron 950 muertes en los Estados Unidos. El virus de la encefalitis japonesa causa de 30 000 a 50 000 casos de enfermedad neurológica al año, principalmente en el este y el sur de Asia. El 25-30 % de los casos informados son fatales. Los virus de la encefalitis transmitida por garrapatas son endémicos en partes de Europa y Asia y continúan causando brotes episódicos que afectan a miles de individuos. Los virus relacionados que tienen diseminación geográfica más limitada incluyen el virus Kunjin (un pariente cercano del virus del Nilo Occidental) y el virus de la encefalitis del valle de Murray en Australia y Nueva Guinea, el virus de la encefalitis de San Luis en América del Norte y del Sur, los virus Usutu, Koutango y Yaonde en África, y el virus Cacipacore en América del Sur.

Se han desarrollado vacunas de virus vivos, atenuados que son seguras y protectoras contra enfermedades causadas por flavivirus, tales como fiebre amarilla y encefalitis japonesa. La vacuna de virus vivo, atenuado, 17D, se ha usado ampliamente para prevenir la fiebre amarilla. Las vacunas de flavivirus actuales se liofilizan en presencia de estabilizantes. No obstante, las vacunas requieren almacenamiento y traslado a 2-8 °C, un requisito que es difícil de cumplir en los países en desarrollo y las regiones más remotas de las naciones desarrolladas. Además, luego de la reconstitución, las vacunas pierden potencia rápidamente incluso cuando se almacenan a 2-8 °C.

La vacuna contra el sarampión es otro ejemplo de un virus lábil atenuado que se usa en todo el mundo para prevenir la enfermedad. El virus del sarampión es un virus ARN de cadena negativa no segmentada con envoltura, de la familia Paramyxovirus. El sarampión es una enfermedad estacional, altamente contagiosa que puede afectar virtualmente a cualquier niño antes de la pubertad en ausencia de vacunación. En países en desarrollo, las tasas de mortalidad en niños infectados por sarampión pueden alcanzar hasta 2 a 15 %. De hecho, a pesar de los esfuerzos para instituir la inmunización en todo el mundo, el sarampión aún causa más de 7000 muertes de niños por año. La vacuna del sarampión es un virus vivo, atenuado que se fabrica en células primarias de fibroblastos de pollo. La vacuna se estabiliza con gelatina y sorbitol y luego se liofiliza. La vacuna estabilizada y liofilizada tiene una vida útil de 2 años o más si se almacena de 2 a 8 °C. Sin embargo, la vacuna liofilizada aún requiere una cadena de frío que es difícil de mantener en los países en desarrollo. Además, luego de la reconstitución, la vacuna pierde el 50 % de su potencia dentro de la hora siguiente a temperatura ambiente (20 a 25 °C).

En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de mejorar las formulaciones de vacunas.

La solicitud de patente internacional WO 03/086443 A1 se refiere a un método para preparar una composición de partículas secadas por congelación en aerosol para la administración intranasal de un material bioactivo y una composición preparada mediante este método.

La solicitud de patente internacional WO 03/087327 A2 se refiere a la conservación de material bioactivo con espuma secada por congelación.

Sumario

El problema que fundamenta la presente invención se soluciona con el contenido de las reivindicaciones independientes adjuntas. Las modalidades preferidas pueden tomarse de las reivindicaciones dependientes.

Más específicamente, el problema que fundamenta la presente invención se soluciona en un primer aspecto que es también la primera modalidad del primer aspecto, con una composición de virus vivo atenuado que comprende:

uno o más virus vivos, atenuados;

5 uno o más copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno (EO-PO), en donde el uno o más copolímeros de bloque EO-PO incluyen poloxámero 407 (Pluronic F127®);

uno o más agentes proteicos, en donde el uno o más agentes proteicos son una o más albúminas, y

uno o más agentes de tipo carbohidrato, en donde el uno o más agentes de tipo carbohidrato incluyen trehalosa,

en donde la composición es capaz de reducir la inactivación del virus vivo atenuado.

10 En una segunda modalidad del primer aspecto que es también una modalidad de la primera modalidad del primer aspecto, los virus vivos, atenuados se seleccionan del grupo que consiste en las familias Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Herpesvirus, Poxvirus y combinaciones de estas.

15 En una tercera modalidad del primer aspecto que es también una modalidad de la primera y la segunda modalidad del primer aspecto, los virus vivos, atenuados son Flavivirus.

En una cuarta modalidad del primer aspecto que es también una modalidad de la primera, la segunda y la tercera modalidad del primer aspecto, la composición se adapta a que sea parcialmente o completamente deshidratada.

20 En una quinta modalidad del primer aspecto que es también una modalidad de la primera, la segunda, la tercera y la cuarta modalidad del primer aspecto, las una o más albúminas son albúminas séricas derivadas de una especie de vertebrado.

En una sexta modalidad del primer aspecto que es también una modalidad de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta y la quinta modalidad del primer aspecto, el uno o más copolímeros de bloque EO-PO es poloxámero 407, el uno o más agentes proteicos es albúmina sérica, y el uno o más agentes de tipo carbohidrato es trehalosa.

25 En una séptima modalidad del primer aspecto que es también una modalidad de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta y la sexta modalidad del primer aspecto, la concentración de poloxámero 407 (Pluronic F217®) es de 0,1 a 4 % (p/v), en donde la concentración de albúmina sérica es de 0,001 a 3 % (p/v) y la concentración de trehalosa es de 5 a 50 % (p/v).

30 En una octava modalidad del primer aspecto que es también una modalidad de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta, la sexta y la séptima modalidad del primer aspecto, la una o más albúminas se seleccionan del grupo que consiste en albúmina sérica bovina y albúmina sérica humana.

35 Más específicamente, el problema que fundamenta la presente invención se soluciona en un segundo aspecto que es también la primera modalidad del segundo aspecto, con un método para disminuir la inactivación de una composición de virus vivo, atenuado que comprende, combinar uno o más virus vivos atenuados con una composición que comprende uno o más copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno (EO-PO), en donde el uno o más copolímeros de bloque EO-PO incluyen poloxámero 407 (Pluronic F127®), uno o más agentes proteicos, en donde el uno o más agentes proteicos son una o más albúminas; y uno o más agentes de tipo carbohidrato incluyen trehalosa, en donde la composición es capaz de reducir la inactivación del virus vivo, atenuado.

40 En una segunda modalidad del segundo aspecto que es también una modalidad de la primera modalidad del segundo aspecto, los virus vivos, atenuados se seleccionan del grupo que consiste en las familias Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Herpesvirus, Poxvirus y combinaciones de estas.

45 En una tercera modalidad del segundo aspecto que es también una modalidad de la primera modalidad del segundo aspecto, la composición aumenta la vida útil de una composición de virus cuando la composición se mantiene a temperatura ambiente o menor en comparación con una composición de control.

En una cuarta modalidad del segundo aspecto que es también una modalidad de la primera modalidad del segundo aspecto, la composición disminuye la inactivación de un virus vivo, atenuado en medio acuoso durante uno o más ciclos de congelación y descongelación en comparación con una composición de control.

50 Más específicamente, el problema que fundamenta la presente invención se soluciona en un tercer aspecto que es también la primera modalidad del tercer aspecto, con un kit para disminuir la inactivación de una composición de virus vivo, atenuado que comprende:

al menos un recipiente; y

5 una composición que comprende uno o más agentes proteicos, en donde el uno o más agentes proteicos son una o más albúminas; uno o más agentes de tipo carbohidrato, en donde el uno o más agentes de tipo carbohidrato incluyen trehalosa; y uno o más copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno (EO-PO), en donde el uno o más copolímeros de bloque EO-PO incluyen poloxámero 407 (Pluronic F127®), en donde la composición disminuye la inactivación de un virus vivo, atenuado.

10 En una novena modalidad del primer aspecto que es también una modalidad de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta y la octava modalidad del primer aspecto, la composición de cualquiera de la primera, la segunda, la tercera, la cuarta, la quinta y la octava modalidad del primer aspecto es para su uso en un método para reducir la aparición de una afección de la salud, o prevenir la misma.

En una décima modalidad del primer aspecto que es también una modalidad de la novena modalidad del primer aspecto la afección de la salud se selecciona del grupo que consiste en Infección del Nilo Occidental, Fiebre del dengue, Encefalitis japonesa, Enfermedad de la selva de Kyasanur, Encefalitis del valle de Murray, Encefalitis de San Luis, Encefalitis transmitida por garrapatas, Fiebre amarilla e Infección por virus de la Hepatitis C.

15 Los aspectos descritos en la presente descripción se relacionan con métodos y composiciones para reducir o prevenir el deterioro o inactivación de una composición de virus vivo atenuado. Determinadas composiciones descritas pueden incluir combinaciones de componentes que reducen el deterioro de un virus vivo atenuado. Otros aspectos en la presente descripción se relacionan con combinaciones de excipientes que aumentan enormemente la estabilidad de virus vivos atenuados. Aún otras composiciones y métodos en la presente descripción se dirigen a reducir la necesidad de temperaturas más bajas (por ejemplo almacenamiento en refrigeración o congelación) a la vez que aumentan la vida útil del virus vivo atenuado en medio acuoso y/o reconstituido.

20 En modalidades de las reivindicaciones, ciertos virus vivos atenuados se dirigen a flavivirus. Las composiciones como se define en las reivindicaciones incluyen, sin limitaciones, uno o más virus vivos, atenuados, tales como uno o más flavivirus vivos, atenuados en combinación con uno o más de los agentes tensoactivos de alto peso molecular, proteínas, y carbohidratos.

25 Las composiciones contempladas en la presente descripción pueden aumentar la estabilización y/o reducir la inactivación y/o degradación de un virus vivo atenuado que incluye, sin limitaciones, un Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Pilovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Pestivirus, Picornavirus, Calicivirus, Reovirus, Parvovirus, Papovavirus, Adenovirus, Herpes virus, o Poxvirus vivos, atenuados.

30 Otras modalidades de las reivindicaciones se relacionan con composiciones de virus vivos, atenuados y métodos dirigidos a composiciones de vacunas capaces de reducir o prevenir la aparición de una afección médica causada por uno o más de los virus contemplados en la presente descripción. De acuerdo con estas modalidades, las afecciones médicas pueden incluir, sin limitaciones, Infección del Nilo Occidental, Fiebre del dengue, Encefalitis japonesa, Enfermedad de la selva de Kyasanur, Encefalitis del valle de Murray, Fiebre hemorrágica de Alkhurma, Encefalitis de San Luis, Encefalitis transmitida por garrapatas, Fiebre amarilla e Infección por virus de la Hepatitis C.

35 En determinadas modalidades de la invención, las composiciones contempladas en la presente descripción pueden encontrarse parcialmente o completamente deshidratadas o hidratadas. En otras modalidades de la invención, los agentes proteicos contemplados para su uso en composiciones en la presente descripción pueden incluir, sin limitaciones, lactoalbúmina, albúmina sérica humana, una albúmina sérica humana recombinante (rHSA), albúmina sérica bovina (BSA), otras albúminas séricas o miembros de la familia de genes de albúmina. En determinadas modalidades de la invención los agentes de tipo sacárido o poliál pueden incluir, sin limitaciones, monosacáridos, disacáridos, alcoholes de azúcares, sacarosa, maltosa, isomaltosa, celobiosa, gentiobiosa, laminaribosa, xilobiosa, manobiosa, lactosa, fructosa, sorbitol, manitol, lactitol, xilitol, eritritol, rafinosa, amilasa, ciclodextrinas, quitosano, o celulosa. En determinadas modalidades de la invención, los agentes tensoactivos pueden incluir, sin limitaciones, un tensoactivo no iónico tal como alquil poli(óxido de etileno), copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) (copolímeros de bloque EO-PO), poli(vinilpirrolidona), alquil poliglucósidos (tales como monoestearato de sacarosa, lauril diglucósido, o mononucleato de sorbitán, octilglucósido y decilmaltósido), alcoholes grasos (alcohol cetílico o alcohol oleílico), o cocamidas (MEA cocamida, DEA cocamida y TEA cocamida).

50 En otras modalidades de la invención, los agentes tensoactivos pueden incluir, sin limitaciones, el Pluronic F68, Pluronic P123, u otros copolímeros de bloque EO-PO de más de 3000-4000 PM.

En algunos aspectos de la descripción, las composiciones de vacunas pueden incluir, sin limitaciones, uno o más agentes proteicos es decir albúmina sérica; uno o más agentes de tipo sacárido que es trehalosa; y uno o más agentes tensoactivos poliméricos es decir el copolímero de bloque EO-PO Pluronic F127.

55 Algunas modalidades de las reivindicaciones se relacionan con composiciones de virus vivos, atenuados parcialmente o completamente deshidratadas. De acuerdo con estas modalidades, una composición puede estar deshidratada en un 20 % o más; 30 % o más; 40 % o más; 50 % o más; 60 % o más; 70 % o más; 80 % o más; o 90

% o más.

- De acuerdo con el método reivindicado para disminuir la inactivación de virus vivos atenuados este método incluye, pero no se limita a combinar uno o más virus vivos atenuados con una composición de acuerdo con el primer aspecto capaz de reducir la inactivación de un virus vivo, atenuado, en donde la composición disminuye la inactivación del virus vivo atenuado. De acuerdo con esta modalidad, el virus vivo atenuado puede incluir, sin limitaciones, un Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Pestovirus, Picornavirus, Calicivirus, Reovirus, Parvovirus, Papovavirus, Adenovirus, Herpes virus, o un Poxvirus. Adicionalmente, los métodos y composiciones descritos en la presente descripción pueden incluir secado por congelación u otros métodos de deshidratación para la combinación.
- De acuerdo con estos métodos y composiciones, los métodos y composiciones disminuyen la inactivación del virus vivo atenuado secado por congelación o parcialmente o completamente deshidratado. En otros métodos, las composiciones para disminuir la inactivación de un virus vivo atenuado pueden comprender una composición acuosa o pueden comprender una composición rehidratada después de la deshidratación. Las composiciones descritas en la presente descripción son capaces de aumentar la vida útil de un virus vivo atenuado en medio acuoso o rehidratado.
- De acuerdo con la invención definida en las reivindicaciones, un virus vivo atenuado para su uso en una composición de vacuna contemplada en la presente descripción puede incluir, sin limitaciones, una o más vacunas de flavivirus vivos, atenuados, que incluyen sin limitaciones, virus de la fiebre amarilla atenuados (tales como SA 14-14-2), virus de la encefalitis japonesa atenuados, (tales como DEN-2/PDK-53 o DEN-4Δ30) o flavivirus quiméricos recombinantes.
- Determinadas composiciones definidas en las reivindicaciones son capaces de disminuir la inactivación y/o degradación de un virus vivo atenuado hidratado, durante más de 24 horas a temperatura ambiente (por ejemplo aproximadamente 20° a aproximadamente 25° C) o a temperaturas de refrigeración (por ejemplo aproximadamente 0° a aproximadamente 10° C). En modalidades más particulares, una composición de combinación es capaz de mantener aproximadamente 100 por ciento del virus vivo atenuado durante más de 24 horas. Además, las composiciones de combinación contempladas en la presente descripción son capaces de reducir la inactivación de un virus vivo atenuado hidratado, durante al menos 2 ciclos de congelación y descongelación. Otros métodos se relacionan con composiciones de combinación capaces de reducir la inactivación de un virus vivo atenuado hidratado, durante aproximadamente 24 horas a aproximadamente 50 días a temperaturas de refrigeración (por ejemplo aproximadamente 0° a aproximadamente 10° C). Las composiciones contempladas en estos métodos, pueden incluir, sin limitaciones, uno o más agentes proteicos de albúmina sérica; uno o más agentes de tipo sacárido de trehalosa; y uno o más agentes de tipo copolímero de bloque EO-PO de Pluronic F127. En determinadas modalidades, la composición de virus vivo atenuado, se mantiene a aproximadamente 100 % de título viral después de 7 días a aproximadamente 21° C y aproximadamente 100 % de título viral después de 50 días a temperaturas de refrigeración alrededor de 4° C. Otras modalidades en la presente descripción pueden incluir composiciones de virus vivos atenuados, que se mantienen a aproximadamente 90 %, o aproximadamente 80 % de título viral después de 7 días a aproximadamente 21° C y aproximadamente 90 %, o aproximadamente 80 % de título viral después de 50 días a temperaturas de refrigeración alrededor de 4° C. Otras modalidades contempladas incluyen composiciones de virus vivos, atenuados que se mantienen a aproximadamente 3x a aproximadamente 10x la concentración del título viral después de varias horas (por ejemplo 20 horas) a aproximadamente 37° C en comparación con otras composiciones conocidas en la técnica (ver por ejemplo, las Figuras 4 y 5). Las composiciones descritas en la presente descripción reducen la degradación del virus vivo, atenuado cuando la composición se almacena, a aproximadamente 37° C.
- Otro aspecto se relaciona con un kit como se define en las reivindicaciones para disminuir la inactivación de una composición de virus vivo atenuado, que incluye, sin limitaciones, un recipiente; y una composición de acuerdo con el primer aspecto en donde la composición disminuye la inactivación y/o degradación de un virus vivo, atenuado. De acuerdo con estos aspectos una composición del kit puede incluir uno o más agentes proteicos de albúmina sérica; uno o más agentes de tipo sacárido de trehalosa; y uno o más agentes de tipo copolímero de bloque EO-PO. Adicionalmente, un kit contemplado en la presente descripción puede incluir además uno o más virus vivos, atenuados que incluyen, sin limitaciones, un Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Pestivirus, Picornavirus, Calicivirus, Reovirus, Parvovirus, Papovavirus, Adenovirus, Herpes virus, o Poxvirus. Las composiciones como se definen en las reivindicaciones incluyen trehalosa como un agente de tipo sacárido. En tales composiciones la concentración de trehalosa puede ser igual o mayor que 5 % (p/v). Las composiciones como se definen en las reivindicaciones incluyen polímero F127 como un agente de tipo copolímero de bloque EO-PO. La concentración de polímero F127 puede ser aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4 por ciento (p/v).

Las composiciones como se definen en las reivindicaciones pueden contener cantidades muy pequeñas de cationes divalentes o ninguna cantidad de estos. Por ejemplo, las composiciones contempladas en la presente descripción pueden tener cantidades muy pequeñas o ninguna cantidad de calcio/magnesio ($\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$).

Breve descripción de las figuras

Las siguientes figuras forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar mejor determinados aspectos de la invención como se define en la presente descripción. Tales aspectos de la invención como se define en las reivindicaciones pueden entenderse mejor en referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada de la presente invención.

La **Figura 1** representa un ejemplo de histograma de experimentos que usan diversas composiciones para analizar la estabilidad de un ejemplo de virus, el flavivirus DEN-2 PDK 53, en las composiciones.

La **Figura 2** representa un ejemplo de gráfico de un análisis cinético de un ejemplo de virus, el flavivirus DEN-2 PDK 53, para la inactivación viral a 37 °C en diversos ejemplos de composiciones.

La **Figura 3** representa un ejemplo de histograma de un análisis de un ejemplo de virus, el virus DEN-2 PDK 53, almacenado a 374 °C durante 21 horas. Los valores se expresan como porcentaje del título viral restante después de la incubación respecto al título inicial. Los porcentajes de la formulación se refieren (p/v) al del excipiente respectivo.

La **Figura 4** representa un ejemplo de histograma de un análisis de un ejemplo de virus, el virus DEN-2 PDK 53, almacenado a 37 °C durante 23 horas en diferentes composiciones. Los valores se expresan como porcentaje del título viral restante después de la incubación respecto al título inicial.

La **Figura 5** representa un ejemplo de histograma de un análisis de un ejemplo de virus, el virus DEN-2 PDK 53, almacenado a 37 °C durante 23 horas en diferentes composiciones. Los valores se expresan como porcentaje del título viral restante después de la incubación respecto al título inicial. Las dos barras para cada formulación representan duplicados del experimento.

La **Figura 6** representa un ejemplo de histograma de un análisis de un ejemplo de virus, el virus DEN-2 PDK 53, después de dos ciclos de congelación y descongelación cuando se almacena en diferentes formulaciones. Los valores se expresan como porcentaje del título viral restante después de los ciclos de congelación y descongelación respecto al título inicial.

La **Figura 7** representa un ejemplo de gráfico de un análisis cinético de un ejemplo de virus, el flavivirus recombinante DEN-2 PDK 53/WN, en diferentes ejemplos de composiciones para la inactivación viral a 25 °C durante varias semanas.

La **Figura 8** representa un ejemplo de gráfico de un análisis cinético de un ejemplo de virus, el flavivirus recombinante DEN-2 PDK 53/WN, en diferentes ejemplos de composiciones para la inactivación viral a 4 °C durante varias semanas.

La **Figura 9** representa un ejemplo de histograma de un análisis de un ejemplo de virus, el virus DEN-2 PDK-53, después de la liofilización en diferentes ejemplos de composiciones. La inactivación viral se evaluó tal como se describió anteriormente después de dos semanas a diferentes temperaturas.

Descripción de modalidades ilustrativas**Definiciones**

Como se usa en la presente descripción, "un" o "una" pueden significar uno o más de uno de un elemento.

Como se usa en la presente descripción, "aproximadamente" puede significar hasta y que incluye más o menos el cinco por ciento, por ejemplo, aproximadamente 100 puede significar 95 y hasta 105.

Como se usa en la presente descripción, agentes de tipo "sacárido" puede significar uno o más monosacáridos, (por ejemplo glucosa, galactosa, ribosa, manosa, ramnosa, talosa, xilosa, o alosarabinosa), uno o más disacáridos (por ejemplo trehalosa, sacarosa, maltosa, isomaltosa, celobiosa, gentiobiosa, laminarribosa, xilobiosa, manobiosa, lactosa, o fructosa), trisacáridos (por ejemplo acarbosa, rafinosa, melizitosa, panosa, o celotriosa) o polímeros de azúcares (por ejemplo dextrano, xantano, pululano, ciclodextrinas, amilosa, amilopectina, almidón, celooligosacáridos, celulosa, maltooligosacáridos, glucógeno, quitosano o quitina).

Como se usa en la presente descripción, agentes de tipo "poliol" puede significar cualquier alcohol de azúcar (por ejemplo manitol, sorbitol, arabitol, eritritol, maltitol, xilitol, glicitol, glicol, poliglicitol, polietilenglicol, polipropilenglicol, o glicerol). Como se usa en la presente descripción, "agentes tensoactivos de alto peso molecular" puede significar una molécula tensoactiva, anfifílica con peso molecular superior a 1500.

Como se usa en la presente descripción, "copolímero de bloque EO-PO" puede significar un copolímero que consiste en bloques de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno). Además, como se usa en la presente descripción, "Pluronic" puede significar copolímeros de bloque EO-PO en EOx-POy-EOx. Esta configuración del copolímero de bloque EO-PO también se refiere como "Poloxámero" o "Synperonic".

Como se usa en la presente descripción, "virus atenuado" puede significar un virus que demuestra signos clínicos de enfermedad reducidos o ausentes cuando se administra a un animal.

Descripción detallada

5 En las siguientes secciones, se describen diversos ejemplos de composiciones y métodos. Será obvio para un experto en la técnica que la puesta en práctica de la invención reivindicada como se define en las reivindicaciones no requiere el empleo de todos o incluso algunos de los detalles reseñados en la presente descripción, sino más bien que las concentraciones, los tiempos y otros detalles específicos pueden modificarse mediante experimentación de rutina. En algunos casos, en la descripción no se han incluido métodos o componentes muy conocidos.

10 La estabilidad de las vacunas de flavivirus ha sido evaluada para los virus vivos atenuados, existentes de la fiebre amarilla y la encefalitis japonesa. Cuando se analizaron en 1987, sólo cinco de las doce vacunas de la fiebre amarilla fabricadas en ese momento cumplían con los estándares mínimos de estabilidad. Posteriormente, se demostró que la adición de una mezcla de azúcares, aminoácidos y cationes divalentes estabilizaba la vacuna liofilizada, por lo que la vacuna perdía menos de 1 log de potencia después de la incubación a 37 °C durante 14 días. Se han descrito formulaciones liofilizadas estabilizantes para la vacuna de la fiebre amarilla (ver por ejemplo la patente de los Estados Unidos núm. 4,500,512). La patente de los Estados Unidos núm. 4,500,512, describe una combinación de lactosa, sorbitol, los cationes divalentes calcio y magnesio, y al menos un aminoácido. Si bien esta formulación puede contribuir a estabilizar la vacuna liofilizada, no proporciona estabilidad a la vacuna en forma acuosa. Otro estudio examinó la capacidad de varias formulaciones diferentes que incluyen las composiciones descritas anteriormente y el efecto de la sacarosa, la trehalosa y la lactoalbúmina sobre la estabilidad de la vacuna de la fiebre amarilla liofilizada. Se halló que las formulaciones que consisten en 10 % de sacarosa sola, 2 % de sorbitol con 4 % de inositol, o 10 % de sacarosa con 5 % de lactoalbúmina, 0,1 g/l de CaCl₂ y 0,076 g/l de MgSO₄ proporcionan la mejor estabilidad (ver por ejemplo Adebayo, Sim-Brandenburg y otros 1998). Sin embargo, en todos los casos después de la resuspensión, la vacuna de la fiebre amarilla continúa siendo muy inestable y debe descartarse después de sólo aproximadamente una hora (ver por ejemplo Monath 1996; Adebayo, Sim-Brandenburg y otros 1998). Esto causa desperdicio de la vacuna y la posibilidad de que se administre una vacuna ineficaz en condiciones de campo, si se usa una vacuna inestable.

30 Otra vacuna de flavivirus vivo atenuado, para la protección contra la encefalitis japonesa ha obtenido licencia y tiene amplio uso en China (ver por ejemplo Halstead y Tsai 2004). La cepa de la vacuna de la encefalitis japonesa SA 14-14-2, se cultiva en células primarias de riñón de hámster y el sobrenadante celular se recolecta y se filtra en grueso. Una composición previa incluía 1 % de gelatina y 5 % de sorbitol añadidos como estabilizantes. Mediante el uso de dichos estabilizantes, la vacuna se liofiliza y luego es estable de 2 a 8 °C durante al menos 1,5 años, pero sólo durante 4 meses a temperatura ambiente y 10 días a 37 °C. Al igual que con la vacuna de la fiebre amarilla, la vacuna reconstituida es muy lábil y es estable durante sólo 2 horas a temperatura ambiente (ver por ejemplo Wanf, Yang y otros 1990). De acuerdo con la invención definida en las reivindicaciones, se contemplan composiciones de virus flavivirus vivos atenuados, para estabilizar o reducir la degradación de la vacuna de la encefalitis japonesa.

No se ha identificado una formulación para una vacuna de flavivirus vivo atenuado, que proporcione estabilidad a largo plazo de las formulaciones liofilizadas a temperaturas superiores a 2 - 8 °C. Además, no se ha descrito ninguna formulación que impida la pérdida del título, que establezca o que reduzca la degradación de vacunas acuosas durante más de unas pocas horas.

40 También se han descrito formulaciones para otros virus vivos atenuados (ver por ejemplo Burke, Hsu y otros 1999). Un estabilizante común, referido como SPGA es una mezcla de 2 a 10 % de sacarosa, fosfato, glutamato de potasio y 0,5 a 2 % de albúmina sérica (ver por ejemplo Bovarnick, Miller y otros 1950). Se han identificado diversas modificaciones de esta formulación básica con diferentes cationes, con sustituciones de hidrolizado de almidón o dextrano por sacarosa, y con sustituciones de hidrolizado de caseína o polivinilpirrolidona por albúmina sérica. Otras formulaciones usan hidrolizado de gelatina en lugar de albúmina sérica como fuente de proteínas (Burke, Hsu y otros 1999). Sin embargo, la gelatina puede causar reacciones alérgicas en niños inmunizados y puede ser causa de eventos adversos relacionados con la vacuna. La patente de los Estados Unidos núm. 6,210,683 describe la sustitución de albúmina sérica humana recombinante por albúmina purificada de suero humano en formulaciones de vacunas.

50 En la presente descripción se describen composiciones que aumentan la estabilidad y/o reducen el deterioro de las vacunas de virus vivos atenuados, en comparación con las de la técnica anterior. Determinadas composiciones descritas en la presente descripción proporcionan estabilidad de los virus en medio acuoso hasta 2 horas; hasta 3 horas; hasta 4 horas y más de 4 horas a aproximadamente 37 °C. Determinadas composiciones descritas en la presente descripción proporcionan estabilidad de los virus en medio acuoso hasta durante 1 día a aproximadamente 1 semana o más, a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo 25 °C). Los aspectos contemplados en la presente descripción proporcionan aumento de la protección de un virus vivo, atenuado por ejemplo contra la congelación y/o descongelación, y/o temperaturas elevadas. En determinados aspectos, las composiciones en la presente descripción pueden estabilizar, reducir el deterioro y/o prevenir la inactivación de los productos de virus vivos atenuados, deshidratados, en condiciones de temperatura ambiente (por ejemplo de aproximadamente 25 °C).
60 En otros aspectos, las composiciones contempladas en la presente descripción pueden estabilizar, reducir el

deterioro y/o prevenir la inactivación de productos de virus vivos atenuados, en medio acuoso a aproximadamente 25 °C o hasta aproximadamente 37 °C. Las composiciones y los métodos descritos en la presente descripción pueden facilitar el almacenamiento, la distribución, el suministro y la administración de vacunas virales en regiones desarrolladas y en vías de desarrollo.

5 De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones las composiciones para vacunas de virus vivos atenuados pueden incluir, sin limitaciones, Picornavirus (por ejemplo, virus de la poliomielitis, virus de la enfermedad del pie y la boca), Calicivirus (por ejemplo, virus del SARS y virus de la peritonitis infecciosa felina), Togavirus (por ejemplo, virus sindbis, los virus de la encefalitis equina, virus chikungunya, virus de rubéola, virus del río Ross, virus de diarrea bovina, virus de la peste porcina clásica), Flavivirus (por ejemplo, virus del dengue, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis japonesa, virus de la encefalitis de San Luis, virus de la encefalitis transmitida por garrapatas), Coronavirus (por ejemplo, coronavirus humanos (resfriado común), virus de la gastroenteritis del cerdo), Rhabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia, virus de estomatitis vesicular), Filovirus (por ejemplo, virus de Marburg, virus del Ébola), Paramyxovirus (por ejemplo, virus de sarampión, virus del moquillo canino, virus de paperas, virus de parainfluenza, virus sincicial respiratorio, virus de enfermedad de Newcastle, virus de la peste), Orthomyxovirus (por ejemplo, virus de la gripe humana, virus de la gripe aviar, virus de la gripe equina), Bunyavirus (por ejemplo, hantavirus, virus de La Crosse, virus de la fiebre del valle del Rift), Arenavirus (por ejemplo, virus de Lassa, virus Machupo), Reovirus (por ejemplo, reovirus humanos, rotavirus humano), Birnavirus (por ejemplo, virus de la bursitis infecciosa, virus de la necrosis pancreática de peces), Retrovirus (por ejemplo, HIV 1, HIV 2, HTLV-1, HTLV-2, virus de la leucemia bovina, virus de la inmunodeficiencia felina, virus del sarcoma felino, virus de tumor mamario murino), Hepadnavirus (por ejemplo, virus de la hepatitis B), Parvovirus (por ejemplo, parvovirus humano B, parvovirus canino, virus de la panleucopenia felina) Papovavirus (por ejemplo, papilomavirus humanos, SV40, papilomavirus bovinos), Adenovirus (por ejemplo, adenovirus humano, adenovirus canino, adenovirus bovino, adenovirus porcino), Herpes virus (por ejemplo, virus herpes simplex, virus varicela-zóster, adenovirus de la rinotraqueítis infecciosa bovina, citomegalovirus humano, herpes virus humano 6), y Poxvirus (por ejemplo, vacuna, virus de la viruela aviar, virus de la viruela del mapache, virus de la viruela de mofeta, virus de la viruela de los monos, virus de la viruela bovina, virus de molusco contagioso).

Los expertos en la técnica, reconocerán que las composiciones o las fórmulas de la presente descripción se refieren a virus atenuados por cualquier medio, que incluye sin limitaciones, pase por cultivos celulares, reorganización, incorporación de mutaciones en clones infecciosos, genética inversa, otras manipulaciones de ADN o ARN recombinante. Además, los expertos en la técnica reconocerán que otras modalidades se refieren a virus que se modifican por ingeniería genética para expresar cualquier otra proteína o ARN que incluyen, sin limitaciones, flavivirus recombinantes, adenovirus recombinantes, poxvirus recombinantes, retrovirus recombinantes, virus recombinantes adenoasociados y herpes virus recombinantes. Dichos virus pueden usarse como vacunas para enfermedades infecciosas, vacunas para tratar afecciones oncológicas, o virus para introducir proteínas expresas o ARN (por ejemplo, terapia génica, terapia antisentido, terapia con ribozimas o terapia con ARN pequeños inhibitorios) con el fin de tratar trastornos.

De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, las composiciones pueden contener uno o más virus con envolturas de membrana (por ejemplo, virus con envoltura) de las familias Togavirus, Flavivirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Herpesvirus o Poxvirus. En determinadas modalidades, las composiciones contienen uno o más virus ARN con envoltura, de las familias Togavirus, Flavivirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus o Retrovirus. En otras modalidades, las composiciones en la presente descripción pueden contener uno o más virus ARN de cadena positiva, con envoltura, de las familias Togavirus, Flavivirus, Coronavirus o Retrovirus. En determinadas modalidades, las composiciones pueden contener uno o más flavivirus vivos, atenuados (por ejemplo, virus del dengue, virus del Nilo Occidental, virus de la fiebre amarilla o virus de la encefalitis japonesa).

Algunas modalidades de la invención como se define en las reivindicaciones en la presente descripción se refieren a composiciones para virus vivos atenuados, en forma acuosa o liofilizada. Los expertos en la técnica reconocerán que las formulaciones que mejoran la estabilidad térmica del virus y previenen la inactivación por congelación y descongelación mejorarán los productos que son líquidos, en polvo, secados por congelación o liofilizados y preparados por los métodos conocidos en la técnica. Después de la reconstitución, dichas vacunas estabilizadas pueden administrarse por diversas vías, que incluyen, sin limitaciones administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intranasal, administración pulmonar o administración oral. Diversos dispositivos se conocen en la técnica para el suministro de la vacuna que incluyen, sin limitaciones, jeringa y aguja para inyección, administración por aguja bifurcada, administración por bombas o parches intradérmicos, suministro por inyección sin aguja, suministro por partículas intradérmicas, suministro por polvo en aerosol.

Los aspectos de la descripción incluyen composiciones que consisten en uno o más virus vivos atenuados (como se describió anteriormente) y una mezcla de uno o más agentes tensoactivos de alto peso molecular y una o más proteínas en un amortiguador fisiológicamente aceptable. En ciertos aspectos, las composiciones incluyen, sin limitaciones uno o más virus vivos atenuados, uno o más agentes tensoactivos de alto peso molecular, una o más proteínas, y uno o más carbohidratos, en un amortiguador fisiológicamente aceptable.

En otros aspectos, las composiciones pueden contener uno o más agentes tensoactivos de alto peso molecular que aumentan la estabilidad térmica de los virus vivos, atenuados. Se han incorporado agentes tensoactivos a las formulaciones de vacunas para prevenir la pérdida de material en superficies tales como frascos de vidrio (ver por ejemplo Burke, Hsu y otros 1999). Sin embargo, determinados aspectos en la presente descripción incluyen agentes tensoactivos de alto peso molecular con algunas propiedades bioquímicas inusuales de utilidad para las composiciones y los métodos descritos en la presente descripción. Los polímeros de bloque EO-PO pueden incluir bloques de óxido de polietileno (-CH₂CH₂O- designado EO) y óxido de polipropileno (-CH₂CHCH₃O- designado PO). El bloque de PO puede encontrarse flanqueado por dos bloques de EO en una disposición EO_x-PO_y-EO_x. Dado que el componente PO es hidrofílico y el componente EO es hidrofóbico, la hidrofiliicidad global, el peso molecular y las propiedades tensoactivas pueden ajustarse mediante la variación de x e y en la estructura de bloque de EO_x-PO_y-EO_x. En soluciones acuosas, los copolímeros de bloque EO-PO se autoensamblarán en micelas con un núcleo de PO y una corona de grupos EO hidrofílicos. Se han investigado formulaciones de copolímeros de bloque EO-PO como potenciales agentes de suministro de fármacos para diversos fármacos hidrofóbicos y para proteínas, ADN o vacunas inactivadas (por ejemplo Todd, Lee y otros 1998; Kabanov, Lemieux y otros 2002). En altas concentraciones (por ejemplo: > que 10 %) algunos de los copolímeros de bloque EO-PO de mayor peso molecular sufrirán gelificación inversa, con formación de un gel a medida que aumenta la temperatura. La formación de gel a temperatura corporal permite que los geles de copolímeros de bloque EO-PO actúen como depósito en aplicaciones de suministro de fármacos y vacunas (ver por ejemplo Coeshott, Smithson y otros 2004). Además, debido a sus propiedades tensoactivas, estos polímeros se han usado en formulaciones adyuvantes, y como emulsionantes en cremas y geles de aplicación tópica. Los copolímeros de bloque EO-PO también han demostrado acelerar la cicatrización de heridas y quemaduras y sellar membranas celulares después de daños mediados por radiación o electroporación.

En otras composiciones de vacunas descritas, pueden incluirse uno o más agentes tensoactivos con peso molecular de 1500 o superior. El agente tensoactivo es un copolímero de bloque no iónico, hidrofílico de polioxietileno y polioxipropileno (o copolímero de bloque EO-PO). Si bien se han usado copolímeros de bloque EO-PO como adyuvantes y vehículos de suministro para vacunas inactivadas, vacunas de proteína o vacunas de ADN, su uso para prevenir la inactivación de un virus vivo no se ha anticipado en la técnica. De acuerdo con la descripción, una formulación puede contener uno o más polímeros EO-PO con un peso molecular de 3000 o superior. De acuerdo con la descripción, las composiciones pueden incluir en parte un copolímero de bloque EO-PO Pluronic F127. Los expertos en la técnica reconocerán que pueden hacerse modificaciones químicas de los agentes tensoactivos.

Se describen composiciones de uno o más virus vivos, atenuados, uno o más agentes tensoactivos y una o más proteínas. La albúmina sérica es una de las proteínas más comunes en la sangre de los vertebrados y tiene múltiples funciones. La proteína tiene 585 aminoácidos con un peso molecular de 66 500. La albúmina sérica humana no está glicosilada y tiene un único grupo tiol libre implicado en algunas de sus múltiples actividades de unión. La albúmina sérica muestra predominio de α -hélice con tres dominios estructurales, cada uno subdividido en dos subdominios. La albúmina es conocida por unirse específicamente a una variedad de moléculas, que incluyen fármacos tales como aspirina, ibuprofeno, halotano, propofol y warfarina así como ácidos grasos, aminoácidos, esteroides, glutatión, metales, bilirrubina, lisolectina, hematina, y prostaglandinas. Los diferentes dominios estructurales se encuentran implicados en la unión a fármacos; la mayoría de los fármacos de moléculas pequeñas y hormonas se unen a uno de los dos sitios primarios ubicados en los subdominios IIA y IIIA. Debido a su falta de inmunogenicidad, la albúmina se usa comúnmente como proteína portadora en productos biológicos. Dado que la dosis de proteína contenida en una vacuna de virus vivo, atenuado puede ser de fracciones de un microgramo (derivado de 10³ a 10⁵ partículas virales), se usa una proteína portadora inerte para prevenir la pérdida por absorción y unión inespecífica a vidrio, plástico u otras superficies. Sin embargo, como se demostró en la presente descripción, se observó una mejora inesperada de la estabilidad con la combinación de una albúmina y copolímeros de bloque EO-PO lo cual sugiere interacciones entre los dos componentes y/o entre los componentes y las partículas virales. Además, no es probable que el aumento de la estabilización de los virus en presencia de albúmina se deba a su función como proteína portadora general: otras proteínas tales como gelatina y lactoferrina no mejoran la estabilidad del virus.

De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, la albúmina sérica puede provenir de una fuente humana o de otro mamífero. Para las vacunas destinadas al uso en humanos, la albúmina sérica puede incluir albúmina humana u otros productos humanos según sea necesario para reducir o eliminar respuestas inmunitarias adversas. Los expertos en la técnica reconocerán que las albúminas específicas para cada especie pueden usarse en vacunas para animales (por ejemplo albúmina canina para productos caninos, albúmina bovina para productos bovinos). En modalidades adicionales, la proteína es una albúmina humana recombinante. Existen métodos estándares para expresar la albúmina humana recombinante o sus porciones en diversos sistemas de expresión que incluyen bacterias, levaduras, algas, plantas, células de mamífero o sistemas de animales transgénicos. Además, puede producirse albúmina sérica o sus porciones en sistemas libres de células o por síntesis química. La albúmina humana recombinante producida en estos y otros sistemas similares se incorpora en la presente descripción. Los expertos en la técnica reconocerán que la albúmina puede sustituirse con otras proteínas. Por ejemplo, la albúmina es un miembro de una familia de múltiples genes. Debido a sus similitudes estructurales y de secuencia, otros miembros de la familia (por ejemplo α -fetoproteína, proteína de unión a vitamina D o afamina) pueden sustituir a la albúmina en las composiciones y los métodos contemplados en la presente descripción. Los expertos en la técnica

también reconocerán que pueden hacerse modificaciones a la albúmina por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, por tecnología de ADN recombinante, por modificación postraduccional, por escisión proteolítica y/o por medios químicos. Dichas sustituciones y alteraciones de la albúmina que proporcionan una función estabilizante esencialmente equivalente a la de la albúmina sérica sin sustituciones y alteraciones se contemplan en la presente descripción.

Se describen composiciones que tienen un agente tensoactivo de alto peso molecular, una proteína y un carbohidrato en un amortiguador farmacéuticamente aceptable. El carbohidrato puede ser un azúcar o un poliol. Los azúcares pueden incluir, sin limitaciones, monosacáridos, (por ejemplo glucosa, galactosa, ribosa, manosa, ramnosa, talosa, xilosa o alosarabinosa), disacáridos (por ejemplo sacarosa, maltosa, isomaltosa, celobiosa, gentiobiosa, laminaribosa, xilobiosa, manobiosa, lactosa, o fructosa), trisacáridos (por ejemplo acarbosa, rafinosa, melizitosa, panosa o celotriosa) o polímeros de azúcares (por ejemplo dextrano, xantano, pululano, ciclodextrinas, amilosa, amilopectina, almidón, celooligosacáridos, celulosa, maltooligosacáridos, glucógeno, quitosano, o quitina). Los polioles pueden incluir, sin limitaciones, manitol, sorbitol, arabitol, eritritol, maltitol, xilitol, glicitol, glicol, poliglicitol, polietilenglicol, polipropilenglicol y glicerol.

De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, la formulación puede contener una combinación de uno o más copolímeros de bloque EO-PO, una o más proteínas, y trehalosa en un amortiguador farmacológicamente aceptable. De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, la trehalosa puede estar presente en concentraciones que varían de 5 a 50 % (p/v). La trehalosa se ha usado para aumentar la estabilidad de las formulaciones proteicas. Se conoce ampliamente en la técnica como crioprotector y se usa en la naturaleza para proteger a los organismos contra el estrés. Los organismos anhidrobióticos capaces de tolerar condiciones de bajo contenido de agua contienen grandes cantidades de trehalosa. Se ha demostrado que la trehalosa previene eventos de fusión de membrana y transiciones de fase capaces de causar desestabilización de la membrana durante el secado. El análisis estructural sugiere que la trehalosa se ajusta bien entre los grupos de las cabezas polares de las bicapas lipídicas. La trehalosa también previene la desnaturalización de proteínas lábiles durante el secado. Se cree que la trehalosa estabiliza las proteínas por formación de puentes de hidrógeno con residuos proteicos polares. La trehalosa es un disacárido que consiste en dos moléculas de glucosa en un enlace 1:1. Debido al enlace 1:1, la trehalosa tiene escaso o nulo poder reductor y en consecuencia esencialmente no reacciona con aminoácidos y proteínas. Esta falta de actividad reductora puede mejorar el efecto estabilizante de la trehalosa sobre las proteínas. La trehalosa puede proporcionar estabilidad a los virus vivos, atenuados. Esta actividad de la trehalosa puede deberse a su capacidad de estabilizar las membranas y las proteínas de la envoltura de los virus.

De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones las composiciones pueden incluir más de un copolímero de bloque EO-PO, más de una proteína y más de un carbohidrato, en donde el más de un carbohidrato es quitosano, en un amortiguador fisiológicamente aceptable para proporcionar mayor estabilidad a los virus vivos, atenuados. Las composiciones pueden incluir quitosano en concentraciones que varían de 0,001 a 2 % (por ejemplo a un pH de aproximadamente 6,8). El quitosano es un polisacárido catiónico derivado de la desacetilación de la quitina, el polímero estructural de los exoesqueletos de los crustáceos. Es un polímero de N-acetilglucosamina y glucosamina; el contenido de los dos carbohidratos depende del grado de desacetilación. La carga positiva del quitosano permite que se una a superficies y moléculas con carga negativa. En consecuencia, se une a superficies mucosas y se cree que promueve la absorción a través de las mucosas. El quitosano también puede unirse y formar nanopartículas con ADN, ARN y otros oligonucleótidos y se ha usado en el suministro de genes no virales. Determinadas modalidades de la presente descripción demuestran que el quitosano aumenta la estabilidad de los virus vivos, atenuados.

De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, pueden describirse composiciones que generalmente incluyen un amortiguador fisiológicamente aceptable. Los expertos en la técnica reconocen que existe una variedad de amortiguadores fisiológicamente aceptables, que incluyen, sin limitaciones amortiguadores que contienen fosfato, TRIS, MOPS, HEPES, bicarbonato, otros amortiguadores conocidos en la técnica y combinaciones de amortiguadores. Además, los expertos en la técnica reconocen que el ajuste de las concentraciones salinas a niveles casi fisiológicos (por ejemplo, solución fisiológica o 0,15 M de sal total) puede ser óptimo para la administración parenteral de composiciones a fin de prevenir el daño celular y/o el dolor en el sitio de la inyección. Los expertos en la técnica también reconocerán que a medida que aumentan las concentraciones de carbohidratos, puede disminuirse las concentraciones de sales a fin de mantener la osmolaridad equivalente de la formulación. En determinadas modalidades, se contempla un medio amortiguador con pH superior a 6,8; algunos virus vivos, atenuados (por ejemplo flavivirus) son inestables a pH bajo. En otras modalidades, el amortiguador fisiológicamente aceptable puede ser solución fisiológica amortiguada con fosfato (PBS).

De acuerdo con la invención como se define en las reivindicaciones, algunas composiciones de vacunas de virus vivos, atenuados se relacionan con composiciones que aumentan la estabilidad y/o reducen el deterioro de los virus vivos, atenuados además de tener reducida inmunogenicidad o de ser no inmunogénicas. Las composiciones pueden incluir más de un agente proteico; más de un agente de tipo sacárido o poliol; y más de un agente tensoactivo de alto peso molecular, en donde la composición disminuye la inactivación del virus vivo atenuado. Determinadas composiciones contempladas en la presente descripción tienen reducida reacción adversa cuando se administran a un sujeto. El o los agentes tensoactivos pueden consistir en más de un copolímero de bloque EO-PO;

el o los agentes proteicos se seleccionan del grupo que consiste en lactoalbúmina, albúmina sérica, α -fetoproteína, proteína de unión a vitamina D, afamina derivada de especies de vertebrados; y el o los agentes de tipo carbohidrato adicionales o más de un sacárido y/o un poliol. En determinadas modalidades, las composiciones pueden incluir uno o más de los agentes de tipo carbohidrato seleccionados del grupo que consiste en sacarosa, quitosano, sorbitol y manitol. Para reducir la reacción inmunitaria contra la vacuna, la albúmina sérica puede derivarse de una especie de vertebrado o en otras modalidades, de la misma fuente que el sujeto (por ejemplo humano). Determinadas composiciones de vacunas de virus vivos atenuados, incluyen el copolímero de bloque EO-PO Pluronic F127 donde la concentración es de 0,1 a 4 % (p/v); y/o la concentración de albúmina sérica es de 0,001 a 3 % (p/v) y/o la concentración de trehalosa puede ser de 5 a 50 % (p/v).

10 Composiciones farmacéuticas

En la presente descripción se describe la administración de composiciones a sujetos en una forma biológicamente compatible, adecuada para la administración farmacéutica in vivo. Por "forma biológicamente compatible, adecuada para la administración in vivo" se entiende una forma del agente activo (por ejemplo, composición de virus vivo, atenuado) a administrar en la que los efectos tóxicos son superados por los efectos terapéuticos del agente activo. La administración de una cantidad terapéuticamente activa de las composiciones terapéuticas se define como una cantidad efectiva, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios para obtener un resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente activa de un compuesto puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad de las formulaciones de inducir una respuesta deseada en el individuo. El régimen de dosis puede ajustarse para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

Las composiciones (por ejemplo, producto farmacéutico, compuesto químico, proteína, péptido) pueden administrarse en una forma conveniente tal como administración subcutánea, intravenosa, por vía oral, inhalación, aplicación transdérmica, aplicación intravaginal, aplicación tópica, administración intranasal o rectal. Más particularmente, el compuesto puede administrarse por vía oral o subcutánea. El compuesto puede administrarse por vía intravenosa. El compuesto puede administrarse por vía intranasal, tal como inhalación.

Un compuesto puede administrarse a un sujeto en un portador o diluyente apropiado, coadministrado con la composición. El término "portador farmacéuticamente aceptable" como se usa en la presente descripción incluye diluyentes tales como soluciones salinas y de amortiguador acuoso. El agente activo también puede administrarse por vía parenteral o intraperitoneal. Las dispersiones también pueden prepararse en glicerol, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas y en aceites. En condiciones normales de almacenamiento y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para prevenir el crecimiento de microorganismos.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable pueden administrarse por medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden usarse soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersión. En todos los casos, la composición puede ser estéril y puede ser fluida en la medida que exista fácil inyectabilidad. También puede conservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicol líquido y similares), y sus mezclas adecuadas. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, por mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y por el uso de agentes tensoactivos.

Las soluciones inyectables estériles pueden prepararse mediante la incorporación de un compuesto activo en una cantidad con un solvente apropiado o con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según corresponda, seguido por esterilización.

Después de la formulación, las soluciones pueden administrarse de una manera compatible con la formulación de la dosis y en tal cantidad que sean terapéuticamente efectivas. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosis, tal como el tipo de soluciones inyectables descrito anteriormente. Se contempla que las cápsulas de liberación lenta, las micropartículas de liberación programada, y similares también pueden emplearse para administrar las composiciones de la presente descripción. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuadas para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal.

Los agentes terapéuticos activos que pueden formularse dentro de una mezcla pueden incluir aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o aun aproximadamente 1 a 10 gramos por dosis. También puede administrarse una dosis única o dosis múltiples en un esquema apropiado para una situación predeterminada. Las dosis pueden administrarse antes, durante y/o después de la exposición a un virus.

Las soluciones o atomizaciones nasales, aerosoles o inhalantes pueden usarse para administrar el compuesto de interés. Las formulaciones adicionales que son adecuadas para otros modos de administración incluyen supositorios y pesarios. También puede usarse un pesario o supositorio rectal. En general, en los supositorios, los aglutinantes y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo, polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios pueden formarse a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el rango de 0,5 % a 10 %, con preferencia 1 % a 2 %.

Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. Las composiciones farmacéuticas orales pueden incluir un diluyente inerte o portador comestible asimilable, o pueden encerrarse en cápsulas de gelatina de cáscara dura o blanda, o pueden comprimirse en comprimidos, o pueden incorporarse directamente con el alimento de la dieta. Para la administración terapéutica oral, los compuestos activos pueden incorporarse con los excipientes y usarse en la forma de comprimidos ingeribles, comprimidos bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas, y similares. Dichas composiciones y preparaciones deben contener al menos 0,1 % del compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones, obviamente, puede variarse y puede estar convenientemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 75 % del peso de la unidad, o con preferencia entre 25-60 %. La cantidad de los compuestos activos en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que permite obtener una dosis adecuada.

Kits

En la presente descripción se describen kits para su uso con los métodos y las composiciones. Las composiciones y las formulaciones de virus vivos pueden proporcionarse en el kit. Los kits también pueden incluir un recipiente adecuado, composiciones de virus vivos atenuados, que se detallan en la presente descripción y opcionalmente uno o más agentes adicionales tales como otros agentes antivirales, antifúngicos o antibacterianos.

Los kits pueden incluir además una composición adecuadamente alicuotada para el uso en un sujeto que lo necesita. Además, las composiciones de la presente descripción pueden encontrarse parcial o totalmente deshidratadas o acuosas. Los kits contemplados en la presente descripción pueden almacenarse a temperatura ambiente o a temperaturas de refrigeración como se describe en la presente descripción de acuerdo con la formulación particular.

El recipiente de los kits generalmente incluirá al menos un frasco, tubo de ensayo, matraz, botella, jeringa u otro medio de recipiente, en el que puede colocarse la composición, y con preferencia, en alicuotas adecuadas. Generalmente, cuando se proporcione un componente adicional, el kit también contendrá uno o más recipientes adicionales en los que puede colocarse este agente o componente. Generalmente, los kits de la presente descripción también incluirán un medio para contener el agente, la composición y otros recipientes de reactivos en aislamiento completo para su venta comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico de inyección o moldeados por soplado en los que se retienen los frascos deseados.

30 Ejemplos

Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar determinados aspectos y modalidades de la invención como se define en las reivindicaciones. Los expertos en la técnica deberán apreciar que las técnicas descritas en los ejemplos siguientes representan técnicas que se sabe que funcionan bien en las prácticas descritas en la presente descripción, y en consecuencia puede considerarse que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberán apreciar, a la luz de la presente descripción, que pueden realizarse muchos cambios en los aspectos y las modalidades específicas de la invención como se define en las reivindicaciones y aún obtener resultados semejantes o similares sin apartarse del espíritu y alcance de la presente descripción.

Ejemplo 1

40 Estabilidad basal de flavivirus DEN-2 PDK 53 en fase líquida

En un método ilustrativo, se investigó la estabilidad térmica de los flavivirus en fase líquida. De acuerdo con este método, se determinó la estabilidad basal del vector de la vacuna original DEN-2 PDK 53, almacenado en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), a diferentes temperaturas (Tabla 1). En un ejemplo, se incubó 1×10^4 pfu de virus DEN-2 PDK 53 en un volumen total de 0,5 ml de PBS, en viales con tapa de rosca de 2 ml a 4 °C, temperatura ambiente (~ 21 °C) o 37 °C. Después de 24 horas de incubación se determinó el título y la actividad viral por un ensayo de titulación en placa recubierta de agarosa con rojo neutro en células Vero. Como se ilustra en la Tabla 1, la incubación de DEN-2 PDK 53 en PBS a 4 °C produce una disminución promedio de 4 veces del título viral y pérdida completa de actividad viral cuando se incubaba a 37 °C durante el mismo período. Estos resultados demuestran una estabilidad relativamente escasa del flavivirus DEN-2 PDK 53 en ausencia de excipientes estabilizantes.

50

Tabla 1 Estabilidad del virus Den-2 PDK53 almacenado durante 24 horas a diferentes temperaturas.

Temperatura	Formulación	Porcentaje de pérdida del título viral
4 °C	PBS	75
~21 °C	PBS	78
37 °C	PBS	100

Ejemplo 2

Efectos estabilizantes de las composiciones

5 En determinadas composiciones, los excipientes farmacéuticamente aceptables contemplados en la presente descripción que ayudan a la estabilidad térmica de las vacunas de virus vivos se conocen en la técnica. En un método, se usó PBS como composición de base para evaluar los efectos estabilizantes de diferentes excipientes. En estos ejemplos, se preparó una solución patrón de cada excipiente en PBS y el pH se ajustó a aproximadamente 7,1 con NaOH, excepto para quitosano donde el pH de la solución patrón se ajustó a aproximadamente 6,8. Los excipientes se diluyeron en PBS a las concentraciones finales indicadas (p/v) (Tabla 2). De acuerdo con este método, 1×10^4 pfu de virus DEN-2 PDK 53, en medio libre de suero, se añadió a 0,5 ml de cada composición y se almacenó a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, se determinó la actividad y el título viral por titulación en placa en células Vero, como se describió anteriormente. Como se ilustra en la Tabla 2, los efectos estabilizantes de las composiciones que incluyen un solo excipiente, a varias concentraciones comparables con los ejemplos experimentales previos, fueron mínimos. Sin embargo, algunos excipientes por ejemplo, trehalosa y albúmina sérica humana recombinante (rHSA), fueron más efectivos que otros en la estabilización del virus DEN-2 PDK 53 a 37 °C. Los resultados del estudio representados en la Tabla 2 también revelaron que el aumento de los efectos estabilizantes de varios excipientes, que incluyen rHSA y trehalosa, puede obtenerse dentro de ciertos rangos de concentraciones de estos excipientes. En este ejemplo particular, la trehalosa fue más efectiva a concentraciones superiores al 15 % (p/v) y F127 a concentraciones entre 0,5 y 3 %.

Tabla 2 Efectos de diferentes excipientes sobre la estabilidad de DEN-2 PDK53 cuando se almacena a 37 °C durante 24 horas.

Formulación	Porcentaje de pérdida del título viral
PBS	100,0
10 % de Sacarosa	99,9
15 % de Sacarosa	98,3
20 % de Sacarosa	96,4
25 % de Sacarosa	93,4
2 % de Trehalosa	98,3
5 % de Trehalosa	97,0
10% de Trehalosa	93,3
15 % de Trehalosa	83,3
2 % de Manitol	100,0
5 % de Manitol	100,0
10 % de Manitol	99,8
15 % de Manitol	86,7
5 % de Sorbitol	100,0
10 % de Sorbitol	99,9
15 % de Sorbitol	99,9
1 % de Polivinilpirrolidona	100,0
5 % de Polivinilpirrolidona	100,0
10 % de Polivinilpirrolidona	100,0
0,2 % de F127	99,6
0,5 % de F127	99,6
1 % de F127	99,5

2 % de F127	99,5
10 % de F127	99,9
0,1 % de rHSA	91,2
0,5 % de rHSA	95,0
1,0 % de rHSA	89,0
3,0 % de rHSA	89,0
5,0 % de rHSA	97,5
0,05 % de Quitosano	99,0
0,1 % de Quitosano	99,0

Ejemplo 3

Efectos estabilizantes de composiciones que incluyen combinaciones específicas de excipientes

5 En el siguiente procedimiento ilustrativo, se analizaron composiciones que incluyen múltiples excipientes en diferentes combinaciones y concentraciones para determinar sus efectos estabilizantes sobre la vacuna de flavivirus DEN-2 PDK 53 original. Los excipientes se diluyeron a las concentraciones finales indicadas en PBS a partir de las soluciones patrón que se describen en el Ejemplo 2. Se incubó 1×10^4 pfu de virus vacunal DEN-2 PDK 53 a 37 °C en 0,5 ml de cada composición durante 21 horas (Figura 1) o durante un período de 48 horas (Figura 2). En los intervalos de tiempo especificados se determinó el título y la actividad viral por un ensayo de titulación en placa como se describió en el Ejemplo 1. La Figura 1 representa resultados ilustrativos de esta demostración expresados como porcentaje del título viral restante después de la incubación, con respecto al inicial, y como \log_{10} de pérdida del título en la Figura 2. El análisis de diferentes combinaciones de excipientes, en esta ilustración particular, reveló que las formulaciones que consisten en un sacárido, un agente tensoactivo no iónico de copolímero Pluronic y una proteína son óptimas para mejorar la estabilidad de DEN-2 PDK 53 a 37 °C. Las formulaciones que incluyen trehalosa, F127 y rHSA presentaron el mayor efecto estabilizante. En forma inesperada, el efecto estabilizante combinado de estos tres excipientes fue mucho mayor que la suma de los observados con cada componente individual lo que sugiere sinergismo entre los componentes. El aumento de la estabilidad térmica del flavivirus DEN-2 PDK 53 obtenido por las actividades sinérgicas de la combinación de trehalosa, F127 y rHSA no se podría haber previsto en base a los ejemplos de la técnica previa. Las Figuras 1 y 2 también ilustran que el efecto estabilizante de la mezcla de trehalosa/F127/rHSA aumentó adicionalmente con la adición de 0,05 % de quitosano. La Figura 2 muestra que la tasa de inactivación viral cuando se almacenó durante un período de 48 horas a 37 °C se redujo significativamente en las composiciones que contienen trehalosa, F127 y rHSA. Los ejemplos de la técnica sugieren que la estabilidad de los flavivirus puede aumentarse con formulaciones que contienen cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+} . Sin embargo, como se representa en las Figuras 1 y 2, la adición de Ca^{2+} (0,0009 M) y Mg^{2+} (0,0005 M) a una formulación no confiere beneficios estabilizantes adicionales. Los resultados de la Figura 2 sugieren que la adición de cationes divalentes puede tener un impacto negativo en la estabilidad viral en fase líquida a largo plazo.

En un método ilustrativo, se evaluó una composición que incluye trehalosa, F127 y rHSA en cuanto a sus propiedades estabilizantes con múltiples flavivirus. La estabilidad de los flavivirus DEN-2 quiméricos que expresan las proteínas de membrana y envoltura de los virus del Nilo Occidental (DEN-2/WN), Dengue 1 (DEN-2/D1), Dengue 3 (DEN-2/D3, o Dengue 4 (DEN-2/D4) se determinó como se describió en el Ejemplo 1. Los resultados ilustrativos de la Tabla 3 revelan el gran aumento de la estabilidad en fase líquida de todos los flavivirus quiméricos cuando se almacenan en una composición que incluye trehalosa, F127 y rHSA. Las diferentes quimeras expresan diferentes proteínas de envoltura y de membrana de cinco flavivirus serológicamente distintos. Además, el virus del Nilo Occidental y los virus del dengue son significativamente divergentes. Este resultado sugiere que las composiciones de la presente descripción pueden ser útiles para la estabilización en fase líquida de diversos miembros de la familia Flaviviridae así como de otras familias de virus. La capacidad de estabilizar los flavivirus a temperatura ambiente (~21 °C) y a 4 °C se examinó por procedimientos representativos como se describió en el Ejemplo 1. Los resultados ilustrativos, ilustrados en la Tabla 4, revelan que una composición que incluye trehalosa, F127 y rHSA conserva efectivamente la actividad viral durante 7 días a 21 °C y durante 48 días a 4 °C.

40

Tabla 3. Estabilidad de diferentes flavivirus quiméricos almacenados a 37 °C durante 21 horas en PBS o una composición (F1) que incluye 15 % de trehalosa, 2 % de F127 y 1 % de rHSA.

Virus	Formulación	% de Título viral restante
DEN-2/WN	PBS	2
	F1	45
DEN-2/D1	PBS	0,2
	F1	22
DEN-2/D3	PBS	0,3
	F1	30
DEN-2/D4	PBS	1
	F1	28

Tabla 4. Estabilidad de flavivirus almacenados a diferentes temperaturas durante 7 o 48 días en PBS o una composición (F1) que incluye 15 % de trehalosa, 2 % de F127 y 1 % de rHSA.

Virus	Temperatura	Formulación	Porcentaje de título viral restante	
			7 días	48 días
DEN-2 PDK-53	21 °C	PBS	0	0
	21 °C	F1	100	0
	4 °C	PBS	0	0
	4 °C	F1	100	100
DEN-2/WN	21 °C	PBS	0	0
	21 °C	F1	100	0
	4 °C	PBS	0	0
	4 °C	F1	100	100

Ejemplo 4

Uso de componentes alternativos

Otro método ilustrativo se usó para comparar los efectos estabilizantes de albúmina sérica bovina (BSA) y, gelatina, con los de rHSA y los de diferentes copolímeros Pluronic. Se realizaron ensayos de estabilidad viral de DEN-2 PDK 53 como se describió previamente para los Ejemplos 1 y 2. Los ejemplos previos sugirieron que las formulaciones que incluyen trehalosa, F127 y rHSA mejoraron óptimamente la estabilidad térmica del virus vacunal original DEN-2 PDK 53. Como se muestra en el ejemplo de la Figura 3, los efectos estabilizantes de la albúmina sérica bovina son comparables con los de rHSA sola o en combinación con trehalosa y F127. La Figura 3 también demuestra que como excipientes aislados, la gelatina es comparable con rHSA para estabilizar DEN-2 PDK 53 a 37 °C. Sin embargo en este método ilustrativo, a diferencia de BSA, la gelatina no parece ser un sustituto efectivo de rHSA en las composiciones que también contienen trehalosa y F127. En consecuencia, si bien pueden usarse proteínas diferentes de rHSA en combinación con trehalosa y F127 para ayudar a la estabilización de las vacunas de flavivirus, el uso de una albúmina sérica o proteínas relacionadas estrechamente es más adecuado de acuerdo con este método ilustrativo. Además, la Figura 3 ilustra que, como excipientes aislados, el polímero Pluronic P123 es comparable con Pluronic F127 en su capacidad de estabilizar el virus DEN-2 PDK-53. Sin embargo, en este método ilustrativo, P123 no parece ser un sustituto efectivo de F127 en las composiciones que también contienen trehalosa y albúmina sérica. Como se ejemplifica en la Figura 4, las composiciones que contienen trehalosa, rHSA y otros agentes tensoactivos farmacéuticos usados comúnmente tales como Polisorbato 20 (Tween 20), en vez de copolímero Pluronic, no son efectivas para estabilizar DEN-2 PDK 53 con respecto a las formulaciones que contienen un copolímero Pluronic. Estos métodos ilustrativos sugieren mejores eficiencias de estabilización de las formulaciones que contienen distintos agentes tensoactivos de copolímero Pluronic de alto peso molecular.

Los datos ilustrativos se ilustran adicionalmente en la Figura 4. La Figura 4 representa la estabilidad del virus DEN-2 PDK 53 en composiciones que contienen diferentes agentes tensoactivos. DEN-2 PDK 53 se almacenó a 37 °C durante 23 horas en cada formulación. Los agentes tensoactivos evaluados en este ejemplo incluyen n-octil-β-D-glucopiranosido (β-OG), Polisorbato 20 (P 20), Polisorbato 80 (P80) y F127 (F). Otros componentes de la

formulación incluyen trehalosa (T) y rHSA (A). Los valores se expresan como porcentaje del título viral restante después de la incubación respecto al título inicial.

Ejemplo 5

Comparación de los efectos estabilizantes de diferentes composiciones

5 Las propiedades estabilizantes de una composición ilustrativa se compararon con las de las composiciones conocidas en la técnica. Una composición estabilizante para vacunas de flavivirus vivos, descrita en la técnica (patente de los Estados Unidos núm. 4,500,512), incluye 4 % de lactosa, 2 % de sorbitol, 0,1 g/l de CaCl₂, 0,076 de MgSO₄ y aminoácidos en el orden de 0,0005 M a 0,05 M en PBS. Otra composición informada por Adebayo y otros (1998) consiste en 10 % de sacarosa, 5 % de lactoalbúmina, 0,1 g/l de CaCl₂, y 0,076 g/l de MgSO₄. En un método
10 ilustrativo, se compararon las propiedades estabilizantes de estas formulaciones con una modalidad particular de la presente descripción. En un ejemplo de composición, F1, esta composición incluye 15 % de trehalosa, 2 % de F127 y 1 % de HSA recombinante. F2 es la formulación de la patente de los Estados Unidos núm. 4,500,512 sin aminoácidos y F3 es la misma formulación con los aminoácidos histidina y alanina. F4 es la composición de Adebayo y otros. Se incubaron 1x10⁴ pfu de virus vacunal de DEN-2 PDK 53 a 37 °C en 0,5 ml de cada composición durante 23 horas, después de lo cual se analizó la actividad y título viral como se describió en el Ejemplo 1. Como se
15 ejemplificó en la Figura 5, algunas modalidades, por ejemplo la formulación F1, representan una mejora significativa respecto a las composiciones descritas previamente. En el ejemplo mostrado, prácticamente no se recuperó actividad viral después del almacenamiento en las formulaciones conocidas en la técnica (formulaciones F3 y F4), mientras que se recuperó más de 50 % del título viral inicial después del almacenamiento en una composición descrita en la presente descripción. Estos resultados revelan que las formulaciones previas no son efectivas para
20 promover la estabilidad de las vacunas de virus vivos durante el almacenamiento en fase líquida.

Ejemplo 6

Conservación de la actividad viral después de múltiples ciclos de congelación y descongelación

25 En un método ilustrativo, se demostró la capacidad de composiciones seleccionadas para conservar la actividad viral después de ciclos de congelación y descongelación. Se suspendió 1x10⁴ pfu de virus vacunal de DEN-2 PDK 53 en 0,5 ml de cada composición en frascos con tapa de rosca. Los frascos del primer ciclo de congelación y descongelación se congelaron a -80 °C durante 24 horas y se descongelaron rápidamente a 37 °C. Esto fue seguido inmediatamente por un segundo ciclo de congelación y descongelación donde los frascos se congelaron a -80 °C durante 1 hora y se descongelaron rápidamente a 37 °C. Luego se evaluó el título y actividad viral con un ensayo de
30 titulación en placa como se describió en el Ejemplo 1. Como se ilustra en la Figura 6, las composiciones particulares que incluyen trehalosa, F127 y rHSA conservaron efectivamente la actividad viral completa a través de dos ciclos de congelación y descongelación. Adicionalmente, las composiciones que incluyen estos tres excipientes fueron más efectivas que las que solo contienen un excipiente único. Los resultados de este experimento ilustrativo particular sugieren que las composiciones y los métodos descritos en la presente descripción son un crioprotector efectivo para las vacunas de flavivirus y pueden facilitar la conservación de los virus durante el secado por congelación, el
35 secado por aspersión u otras técnicas de deshidratación.

Ejemplo 7

Estabilización de otros virus vivos, atenuados.

40 Los ejemplos ilustrados previamente revelan la estabilización en fase líquida efectiva de varios flavivirus vivos atenuados, en composiciones que incluyen trehalosa, F127 y rHSA. Se prevé que las modalidades descritas en la presente descripción también pueden ser efectivas para estabilizar otros virus vivos, atenuados. Por ejemplo, una formulación que incluye trehalosa, F127 y rHSA puede usarse para estabilizar virus de sarampión vivo atenuado, un virus sindbis atenuado, un virus de gripe atenuado, un adenovirus recombinante atenuado, o un virus vacuna recombinante atenuado. En un método ilustrativo, estos virus no flavivirales pueden suspenderse y mantenerse en
45 fase líquida, en una composición que incluye trehalosa, F127, y rHSA directamente después de la recolección del cultivo celular. En otro método ilustrativo, los virus no flavivirales pueden suspenderse en una composición antes, o después de secar por congelación o por aspersión. El aumento estadístico de la estabilidad viral puede demostrar que la formulación de esta modalidad es aplicable a otras vacunas de virus atenuados fuera de la familia de los Flavivirus. Los expertos en la técnica reconocen que la aplicación puede extenderse después a otros virus vivos, atenuados.
50

Ejemplo 8

Seguridad e inmunogenicidad *in vivo*.

55 Las interacciones moleculares entre los excipientes y componentes moleculares o celulares pueden servir, no solo para aumentar la estabilidad de las vacunas virales, sino también para producir aumento del daño celular o tisular *in vivo*. Las formulaciones pueden reducir la inmunogenicidad de estas vacunas virales en animales vivos. En este ejemplo, se demuestra que los ejemplos de composiciones son seguros después de la inyección subcutánea y

esencialmente son inertes inmunológicamente. Se seleccionaron cuatro composiciones ilustrativas diferentes para pruebas en ratones de la siguiente manera.

Formulación 1: 15 % de Trehalosa, 2 % de F-127, 1 % de rHSA

Formulación 2: 15 % de Trehalosa, 2 % de F-127, 1 % de rHSA, 1 mM de CaCl₂/ 0,5 mM de MgSO₄

5 Formulación 3: 15 % de Trehalosa, 2 % de F-127, 1 % de rHSA, 0,5 % de quitosano

Formulación 4: 22,5 % de Trehalosa, 3 % de F-127, 1,5 % de rHSA

Formulación 5: PBS

10 En determinados métodos descritos en la presente descripción, se inmunizaron grupos de 8 o 9 ratones NIH Swiss por inyección subcutánea con 1x10⁵ pfu de una vacuna de flavivirus recombinante DEN-2 PDK-53/WN formulada en el día 0 (d0), se administró un refuerzo con la misma vacuna formulada en el día d29 y luego se estimularon con 10³ pfu de una cepa patogénica de Nilo Occidental (NY99) en el día d45. Los ratones de control (cuatro grupos de 8) recibieron las formulaciones 1-4 solas sin virus. No se observaron eventos adversos después de la administración en ninguno de los ratones inmunizados. En consecuencia, en este ejemplo, no se producen eventos adversos evidentes con las formulaciones ilustrativas con o sin virus vacunal. Se recolectaron los sueros antes de la inmunización en d0, 15 antes del refuerzo en d28, antes del estímulo en d44 y después del estímulo en d75. Los títulos de anticuerpo neutralizante para el virus del Nilo Occidental en los sueros se determinaron con la prueba de neutralización por reducción en placa (PRNT). Los resultados del estudio se representan en la Tabla 5.

Tabla 5: Anticuerpo neutralizante y protección inducidos por las vacunas de DEN2/WN formuladas

Formulación	Número	Post-activación (d28)		Post-refuerzo (d44)		Post-estímulo (d75)		Supervivencia	% de supervivencia
		GMT ¹	% SC ²	GMT	% SC	GMT	% SC		
1	8	30	87,5	123	100	761	100	8/8	100
2	8	10	62,5	226	100	830	100	8/8	100
3	8	40	100	123	100	1810	100	8/8	100
4	9	10	66,7	137	100	1660	100	8/9	88,9
5	9	10	66,7	109	100	1742	100	9/9	100
Controles	32	1	0	1	0	1280	100	7/32	21,9

¹GMT = media geométrica del título; a los títulos de <10 se asignó arbitrariamente un valor de 1.
²% SC = porcentaje de animales que se seroconvirtieron con títulos de PRNT >10

20 La mayoría de los animales que recibieron la vacuna DEN-2/WN se seroconvirtieron después de la primera dosis independientemente de si se usó uno de las formulaciones ilustrativas (Formulaciones 1 - 4) o ninguna de estas formulaciones (Formulación 5). Además, todos los animales vacunados se seroconvirtieron después de la administración del refuerzo. La media geométrica de los títulos de PRNT (GMT) demuestra pocas diferencias entre los grupos de vacunas. Los títulos fueron bajos después de la inmunización primaria, aumentaron 3-10 veces 25 después del refuerzo y luego mostraron una respuesta anamnésica marcada después del estímulo. El 100 % de todos los animales vacunados sobrevivió al estímulo, nuevamente en forma independiente de la formulación de la vacuna. Solo 22 % de los animales de control sobrevivieron; los que sobrevivieron mostraron evidencia de potentes respuestas de anticuerpos, neutralizantes después del estímulo. Una ventaja es que este ejemplo demuestra que las formulaciones ilustrativas no reducen la capacidad de una vacuna ilustrativa de DEN-2/WN recombinante para 30 prevenir la enfermedad del Nilo Occidental en los ratones.

Ejemplo 9

35 En otro ejemplo, se usaron composiciones líquidas que contienen trehalosa, rHSA y F127 para estabilizar un flavivirus quimérico del Nilo Occidental almacenado durante varios periodos a 25 °C o 4 °C. Se incubó 1x10⁴ pfu de virus vacunal DEN-2/WN quimérico a cada temperatura y se evaluó la actividad viral a intervalos de una o dos semanas como se describió en el Ejemplo 1. Como se ilustra en las Figuras 7 y 8, las formulaciones que contienen trehalosa, rHSA y F127 aumentaron significativamente la estabilidad térmica del virus vacunal DEN-2/WN durante el almacenamiento a 25 °C y 4 °C, respectivamente. A 25 °C la pérdida de actividad viral fue menor de un log durante 7 días. A 4 °C la inactivación viral fue insignificante durante periodos de hasta 12 semanas cuando se almacenaron en

formulaciones ilustrativas que incluyen trehalosa, F127 y rHSA.

Ejemplo 10

- 5 En otro método ilustrativo, se demostraron los efectos estabilizantes de composiciones que incluyen trehalosa, rHSA y un copolímero Pluronic con vacunas de DEN-2 PDK 53 deshidratadas. Se formuló 1×10^4 pfu de virus vacunal DEN-2 PDK 53 de acuerdo con los procedimientos descritos en la presente descripción. Las vacunas formuladas se colocaron en frascos de suero y se sometieron a procedimientos de liofilización convencionales. Las vacunas secas se taparon al vacío, se almacenaron a 37 °C o 4 °C durante 14 días seguido por la reconstitución de la vacuna a su volumen de líquido original por la adición de agua estéril. Se evaluó la actividad viral de la vacuna reconstituida como se describió anteriormente. A 37°C, en presencia de las composiciones que contienen trehalosa, rHSA y un copolímero Pluronic formuladas en solución salina amortiguada con fosfato, se observó un promedio de pérdida del título viral de 1 log (Figura 9). No se observó pérdida de la actividad viral para las vacunas de virus DEN-2 PDK 53 formuladas y deshidratadas que se almacenaron a 4 °C durante 14 días. Estos resultados, demuestran la conservación efectiva de una vacuna viral deshidratada con el uso de las composiciones descritas en la presente descripción.
- 10
- 15 La Figura 9 representa la estabilidad de DEN-2 PDK 53 liofilizado a diferentes temperaturas. Se evaluó la pérdida del título en log del virus vacunal DEN-2 PDK 53 formulado y liofilizado, después de la incubación a 37 °C o 4 °C durante 2 semanas según se indicó. Las formulaciones F1 (15 % de trehalosa, 2 % de F127, 1 % de rHSA) y F2 (15 % de trehalosa, 2 % de F127, 0,01 % de rHSA) se formularon en solución salina amortiguada con fosfato. La formulación F3 (15 % de trehalosa, 2 % de F127, 0,01 % de rHSA) se formuló en 10 mM de base Tris.
- 20 Todas las COMPOSICIONES y MÉTODOS descritos y reivindicados en la presente descripción pueden realizarse y ejecutarse sin experimentación indebida a la luz de la presente descripción.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de virus vivo atenuado que comprende:
 - uno o más virus vivos, atenuados;
 - 5 uno o más copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno (EO-PO), en donde el uno o más copolímeros de bloque EO-PO incluyen poloxámero 407 (Pluronic F127®);
 - uno o más agentes proteicos, en donde el uno o más agentes proteicos son una o más albúminas, y
 - uno o más agentes de tipo carbohidrato, en donde el uno o más agentes de tipo carbohidrato incluyen trehalosa,

en donde la composición es capaz de reducir la inactivación del virus vivo atenuado.
- 10 2. La composición según la reivindicación 1, en donde los virus vivos, atenuados se seleccionan del grupo que consiste en las familias Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Herpesvirus, Poxvirus y combinaciones de estas.
- 15 3. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, en donde los virus vivos, atenuados son Flavivirus.
4. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde la composición se adapta a que sea parcialmente o completamente deshidratada.
- 20 5. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde la una o más albúminas son albúminas séricas derivadas de una especie de vertebrado.
6. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en donde el uno o más copolímeros de bloque EO-PO es poloxámero 407, el uno o más agentes proteicos es albúmina sérica, y el uno o más agentes de tipo carbohidrato es trehalosa.
- 25 7. La composición según la reivindicación 6, en donde la concentración de poloxámero 407 (Pluronic F127®) es de 0,1 a 4 % (p/v), en donde la concentración de albúmina sérica es de 0,001 a 3 % (p/v) y la concentración de trehalosa es de 5 a 50 % (p/v).
- 30 8. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde la una o más albúminas se seleccionan del grupo que consiste en albúmina sérica bovina y albúmina sérica humana.
- 35 9. Un método para disminuir la inactivación de una composición de virus vivo, atenuado que comprende, combinar uno o más virus vivos atenuados con una composición que comprende uno o más copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno (EO-PO), en donde el uno o más copolímeros de bloque EO-PO incluyen poloxámero 407 (Pluronic F127®), uno o más agentes proteicos, en donde el uno o más agentes proteicos son una o más albúminas; y uno o más agentes de tipo carbohidrato, en donde el uno o más agentes de tipo carbohidrato incluyen trehalosa, en donde la composición es capaz de reducir la inactivación del virus vivo, atenuado.
- 40 10. El método según la reivindicación 9, en donde los virus vivos atenuados, se seleccionan del grupo que consiste en las familias Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Herpesvirus, Poxvirus y combinaciones de estas.
- 45 11. El método según la reivindicación 9, en donde la composición aumenta la vida útil de una composición de virus cuando la composición se mantiene a temperatura ambiente o menor en comparación con una composición de control.
- 50 12. El método según la reivindicación 9, en donde la composición disminuye la inactivación de un virus vivo, atenuado en medio acuoso durante uno o más ciclos de congelación y descongelación en comparación con una composición de control.
13. Un kit para disminuir la inactivación de una composición de virus vivo, atenuado que comprende:
 - al menos un recipiente; y
 - 55 una composición que comprende uno o más agentes proteicos, en donde el uno o más agentes proteicos son una o más albúminas; uno o más agentes de tipo carbohidrato, en donde el uno o más agentes de tipo carbohidrato incluyen trehalosa; y uno o más copolímeros de bloque de polioxietileno y polioxipropileno (EO-PO), en donde el uno o más copolímeros de bloque EO-PO incluyen poloxámero

407 (Pluronic F127®), en donde la composición disminuye la inactivación de un virus vivo, atenuado.

14. La composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, para su uso en un método para reducir la aparición de una afección de la salud o prevenir la misma.

5 15. La composición según la reivindicación 14, en donde la afección de la salud se selecciona del grupo que consiste en Infección del Nilo Occidental, Fiebre del dengue, Encefalitis japonesa, Enfermedad de la selva de Kyasanur, Encefalitis del valle de Murray, Encefalitis de San Luis, Encefalitis transmitida por garrapatas, Fiebre amarilla e Infección por virus de la Hepatitis C.

10

Fig. 1
Figura 1

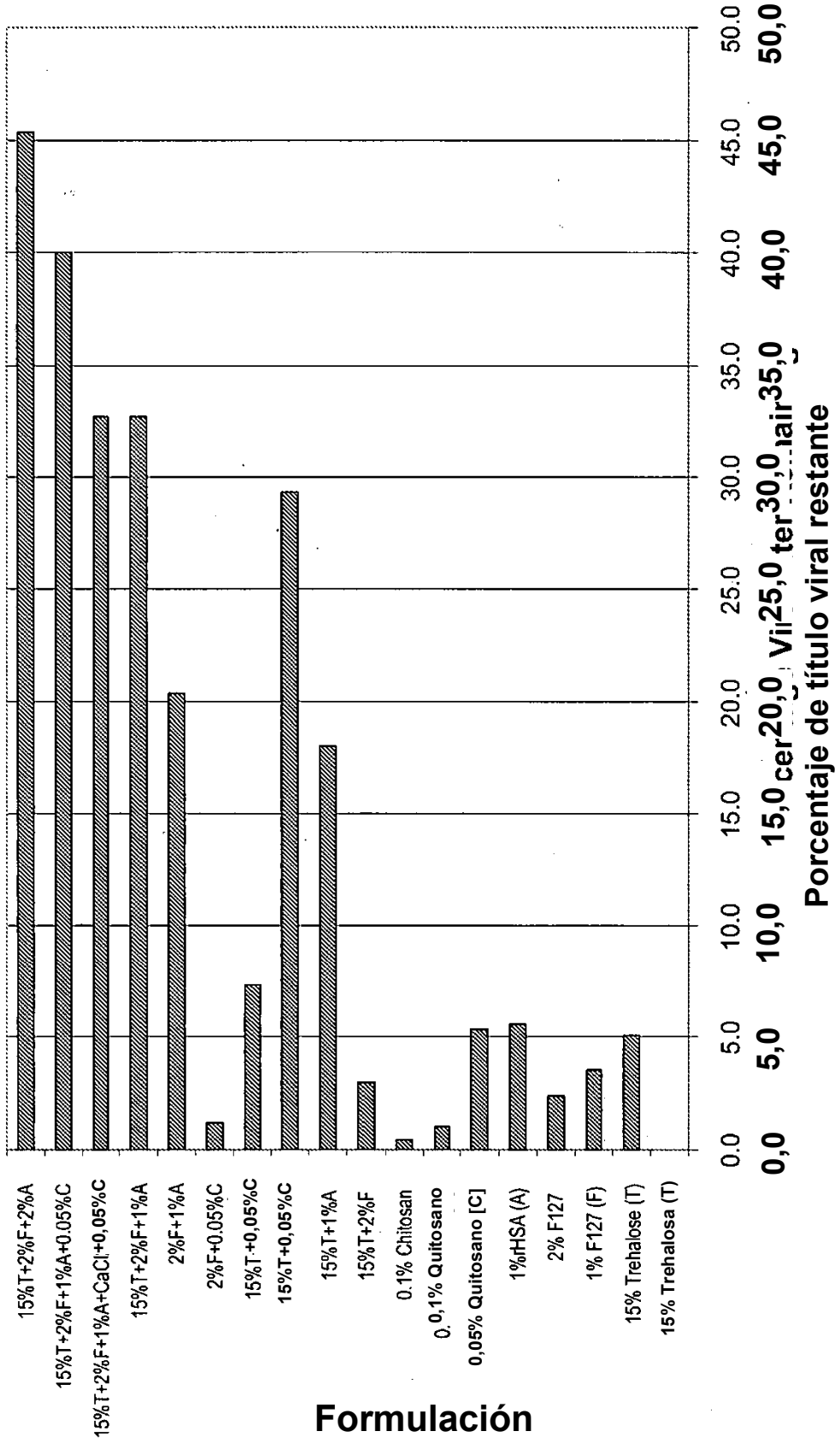


Figura 2

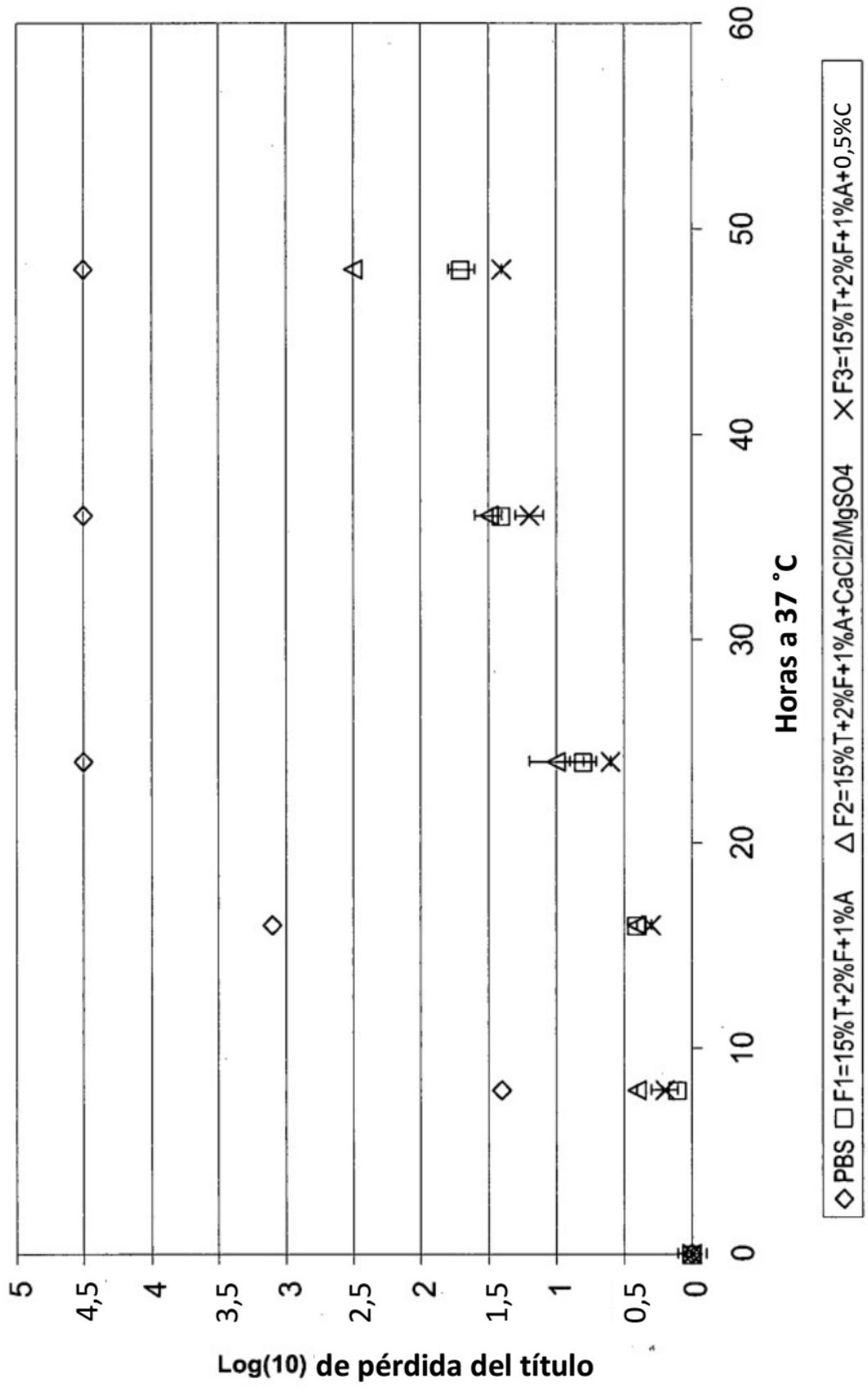


Figura 3

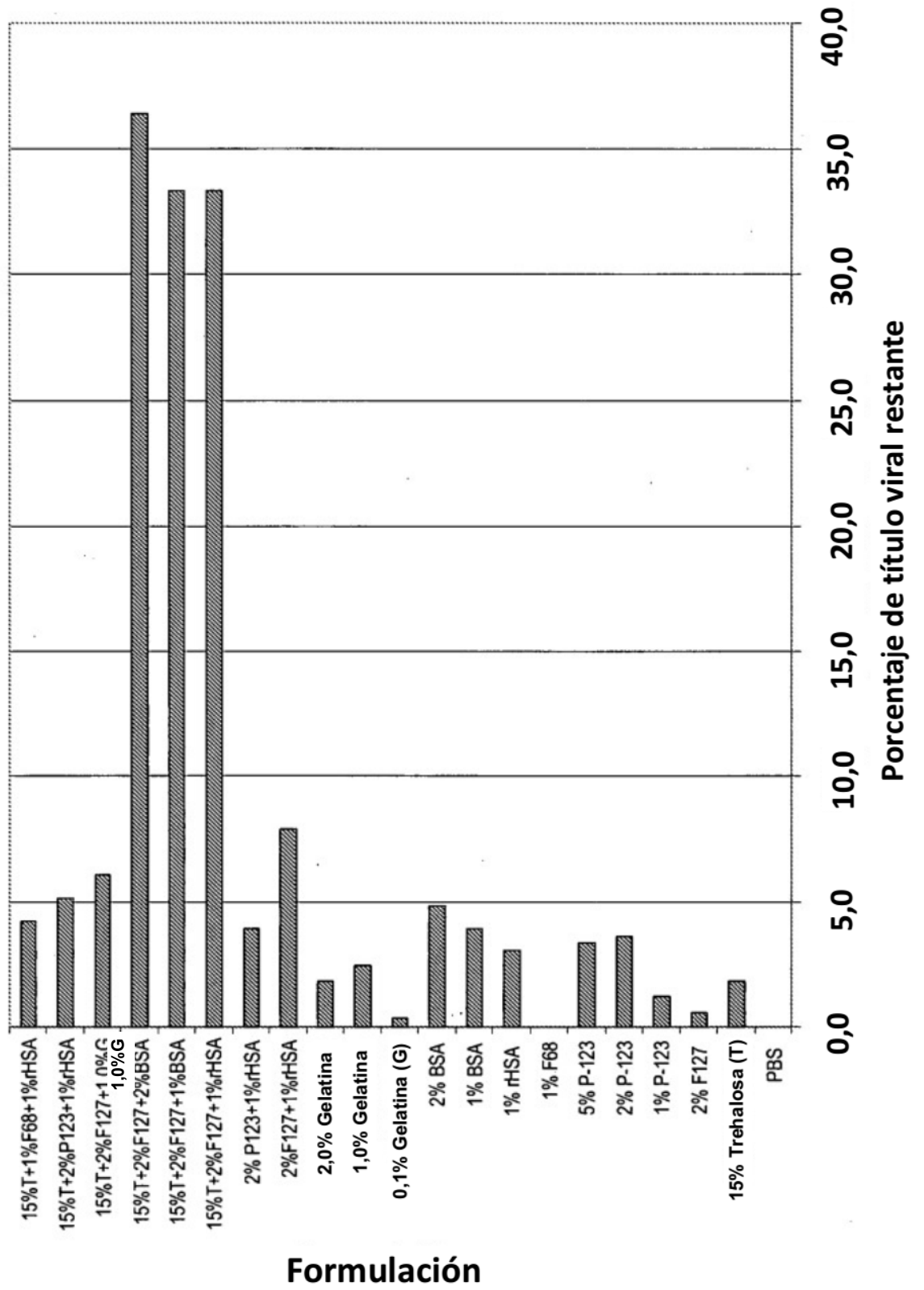


Figura 4

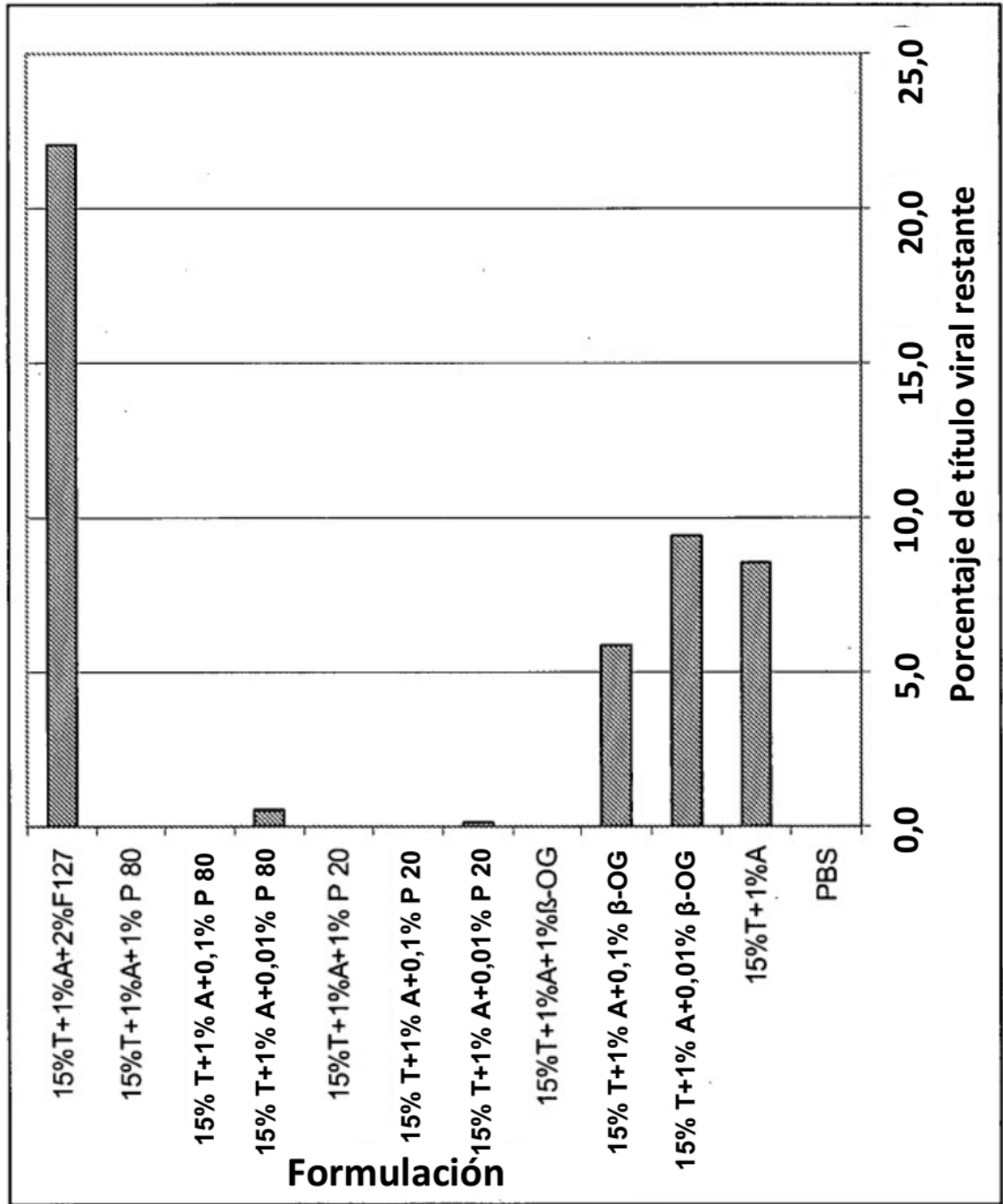


Figura 5

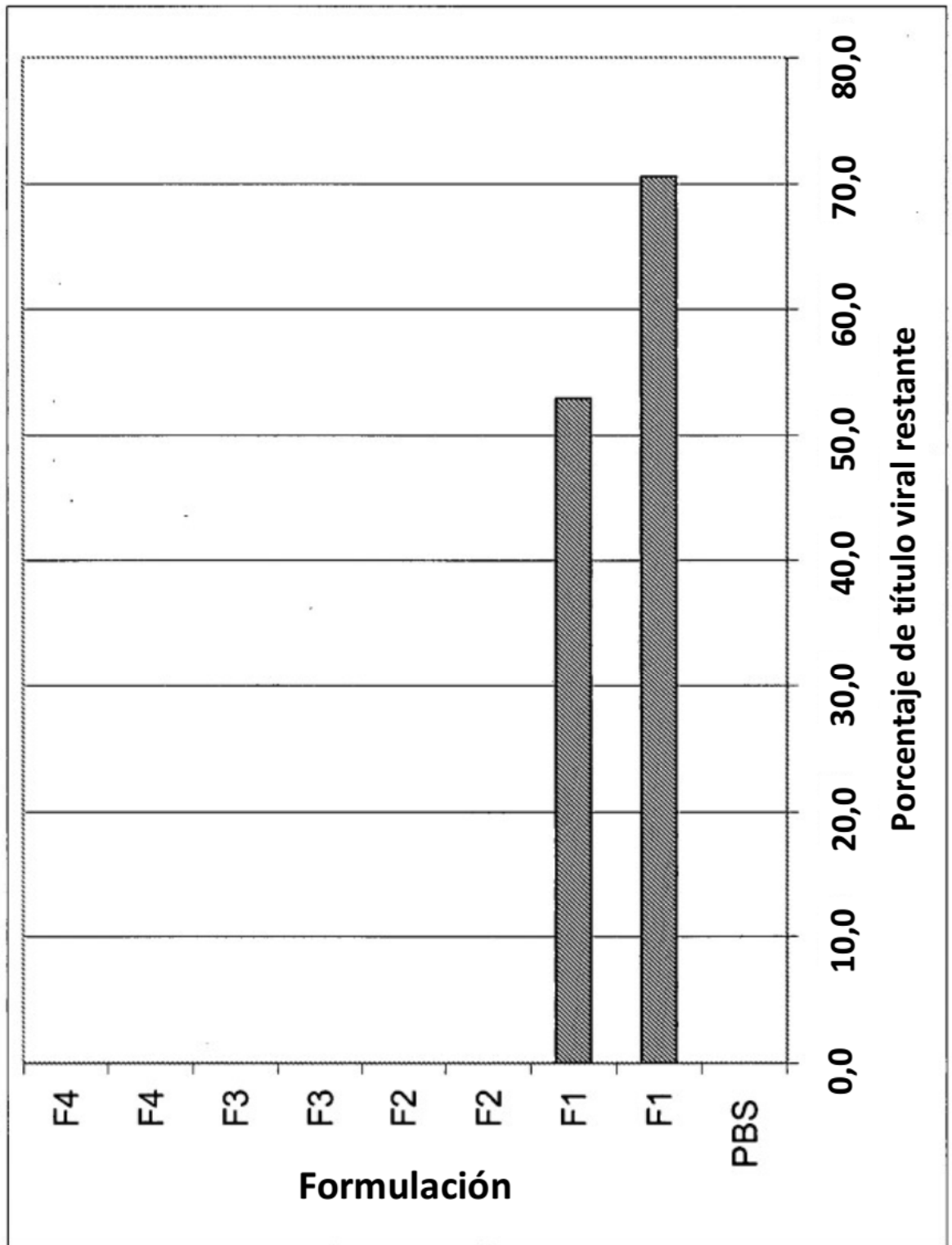


Figura 6

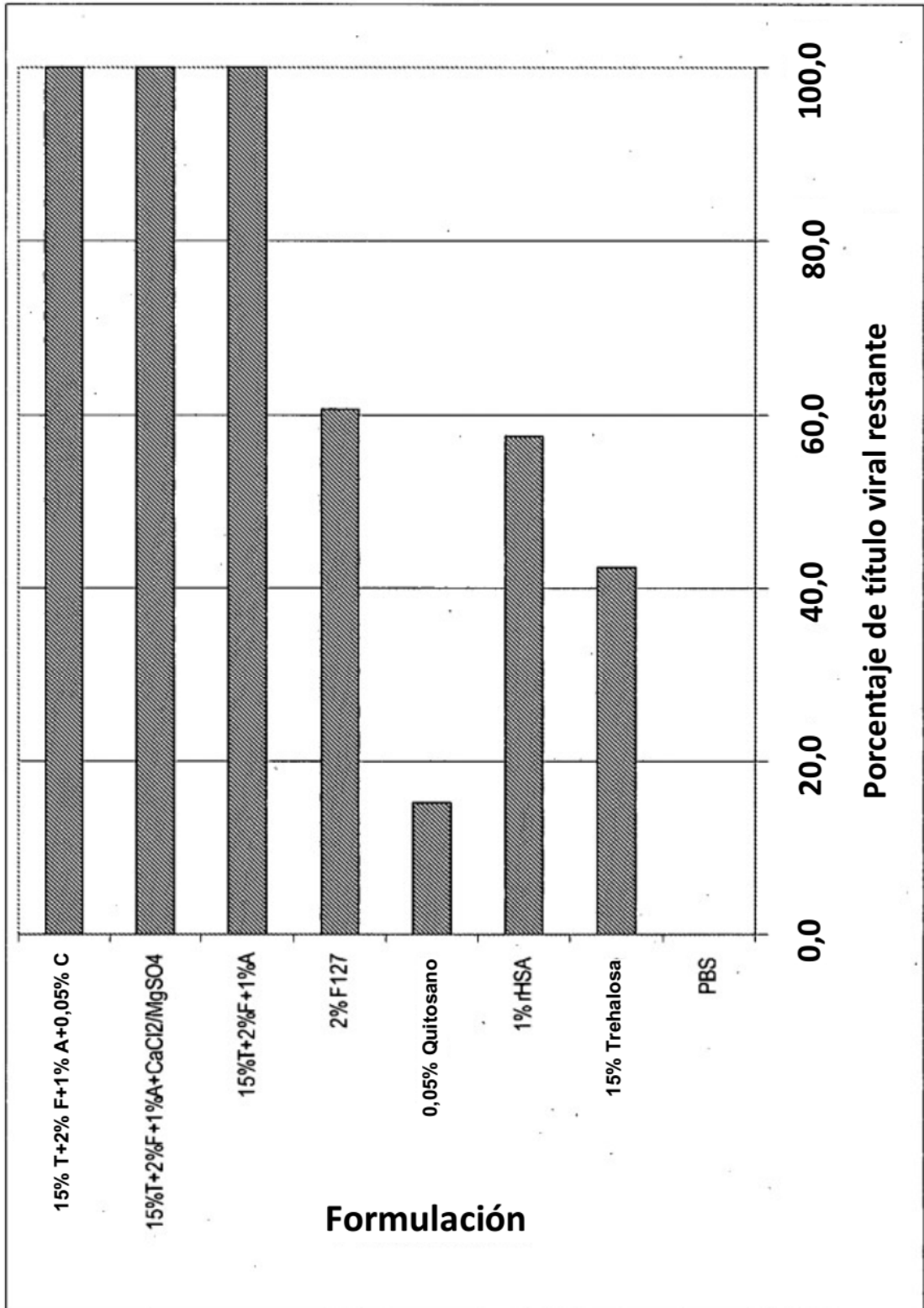


Figura 7

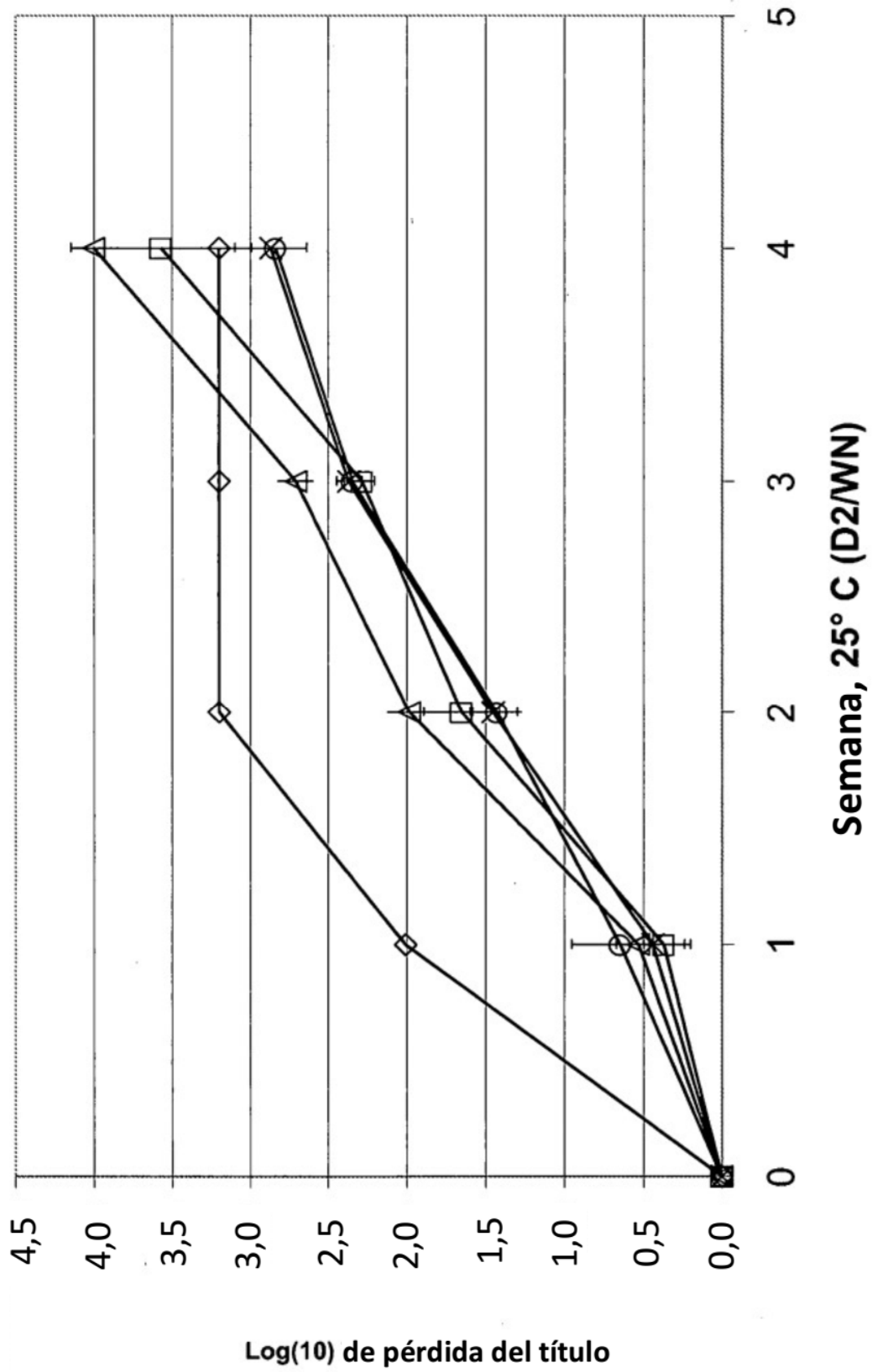


Figura 8

