

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 661 215**

51 Int. Cl.:

A61K 39/12 (2006.01)

A61K 39/235 (2006.01)

C12N 15/861 (2006.01)

C12N 15/33 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2010 PCT/US2010/035521**

87 Fecha y número de publicación internacional: **25.11.2010 WO10135495**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2010 E 10778366 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.01.2018 EP 2432502**

54 Título: **Composiciones víricas; inmunógenas; secadas por pulverización; estables**

30 Prioridad:

20.05.2009 US 179744 P

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

28.03.2018

73 Titular/es:

**AERAS (100.0%)
1405 Research Boulevard, 3rd Floor
Rockville, MD 20850, US**

72 Inventor/es:

**JIN, TOM, HAN y
TSAO, ERIC, I-FU**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 661 215 T3

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

DESCRIPCIÓN

Composiciones víricas; inmunógenas; secadas por pulverización; estables

Antecedentes

5 El secado por pulverización, mediante el cual un líquido se transforma en partículas de polvo seco mediante nebulización de gotitas en aire caliente de secado, se ha recomendado como alternativa a la liofilización para la preparación de productos de inhalación, ya que representa un proceso refinado de una sola etapa para producir formulaciones biofarmacéuticas con características de partícula únicas (véase, Ameri M., Maa Y.F. (2006) *Drying Technology* 24; 763-768; Maa Y.F., Nguyen P.A., Sweeney T.D., Shire S.J., Hsu C.C. (1999) *Pharmaceutical Research* 16: 249-254; Chen D., Maa Y.F., Haynes J. (2002) *Expert Vaccine Review* 1:265-276; y Broadhead J., Rouan S., Rhodes C. (1992) *Drug Devel. Indust. Pharm.* 18:11694206). El secado por pulverización tiene la ventaja adicional de ser un proceso de deshidratación más rápido y más rentable que la congelación. En la última década, han surgido numerosas tecnologías de administración de proteínas, de las cuales varias son métodos basados en polvos, tales como microesferas para liberación prolongada, polvos finos para administración pulmonar y polvos biofarmacéuticos/vacunas para administración intradérmica (véase, Patton, J.). (1998) *Nat. Biotechnol.* 16:141-143; Dilraj A., Cutts F.T., de Castro J.F., Wheeler J.G., Brown D., Röth C., Coovadia H.M., Bennett J.V. (2000) *Lancet* 355; 798-803; Dilraj A., Sukhoo R., Cutts F.T., y Bennett J.V. (2007) *Vaccine* 25:4170-4174; Philip V.A., Mehta R.C., Mazumder M.K., DeLuca P.P. (1997) *Int. J. Phar.* 151:165-174; Chan H.K., Clark A., Gonda I., Mumenthaler M., Hsu C. (1997) *Pharm. Res.* 14:431-437; Martonen T., Katz I. (1993) *J. Aerosol. Med.* 6:251-274; Chew N.Y.K., Bagster D.F., Chan H.K. (2000) *Int. J. Pharm.* 206:75-83; Broadhead J., Rouan S., Hau I., Rhodes C. (1994) *J. Pharm. and Pharm.* 46:458-467; y Tzannis S.T., Prestrelski S.J. (2000) *J. Pharm. Sci.* 88:360-370). Con la llegada de estas tecnologías, están aumentando los esfuerzos para identificar métodos apropiados de formación de polvo. Convendría tener una formulación de polvo estable para virus usados en vacunas mediante la cual los virus sobreviven a procedimientos de secado por pulverización y almacenamiento. Además, convendría tener una formulación de virus estable, secada por pulverización, en polvo seco, adecuada para la administración por inhalación u otras vías.

El documento WO 2005/123131 A2 se refiere a partículas de polvo que contienen material bioactivo obtenido por pulverización a alta presión de los materiales bioactivos en solución o suspensión.

Compendio

30 La invención incluye un método para estabilizar virus en polvo seco de pulverización, así como a una composición inmunógena que contiene un virus en un polvo secado por pulverización de manitol-ciclodextrin-trehalosa-dextrano (MCTD) como se define en las reivindicaciones. Los experimentos han demostrado que los virus sobreviven al secado por pulverización y posterior almacenamiento en forma de polvo con MCTD a una velocidad que los hace viables como composiciones inmunógenas de polvo seco adecuadas para vacunaciones masivas.

Descripción de los dibujos

35 Figura 1. Distribución del tamaño de partícula del virus de rAd35.

El tamaño del virus rAd35 de la vacuna se midió mediante una centrífuga de discos CPS. Se usaron 8% y 24% de sacarosa en amortiguador de muestra para soluciones en gradiente.

Figura 2A. Temperatura de transición vítrea (T_g) de la muestra de polvo de MCTD

40 Figura 2B. Temperatura de transición vítrea (T_g) de la muestra de polvo de trehalosa para las figuras 2A-B, la temperatura de transición vítrea (T_g) se determinó mediante una DSC 823°. En la tapa del crisol se perforó un pequeño orificio antes del análisis. La muestra (aproximadamente 10 mg) se calentó desde 25°C hasta 170°C con una velocidad de barrido de 10,0°C/min. La celda de muestra se purgó con gas nitrógeno a 10,0 ml/min.

Figura 3. Distribución de partículas del polvo de MCTD

45 Las distribuciones del tamaño de partícula se midieron por difracción de láser (Mastersizer 2000). La polidispersidad del polvo fue expresada por la longitud. Longitud = $[D(v, 90) - D(v, 10)]/D(v, 50)$, donde $D(v, 90)$, $D(v, 10)$ y $D(v, 50)$ son los diámetros de volumen equivalente a 90, 10 y 50% del volumen acumulado, respectivamente.

Figura 4A. Imagen del microscopio (x 1.000) de la partícula generada a partir de la formulación a base de manitol. El polvo se volvió a poner en suspensión en metanol anhidro a 20 mg/ml.

50 Figura 4B. Imagen de microscopio (x 1.000) de la partícula generada a partir de la formulación de trehalosa. El polvo se volvió a poner en suspensión en aceite Halocarbon 0.8 a 20 mg/ml.

Figura 5. Aumento en el contenido de agua de las formulaciones de polvo anhidro expuestas al 70% de humedad relativa.

Figura 6. La recuperación de TCID₅₀ (log pérdida) de rAd35 en diferentes formulaciones durante el proceso de secado por pulverización.

5 La recuperación de TCID₅₀ se expresa como la pérdida de infectividad de rAd35 entre las muestras de secado previo a la pulverización y las de secado posterior a la pulverización. Los cambios de valor se expresan en log pérdida por gramo de sólidos o polvo. Man = manitol; ManLeu = manitol mezclado con leucina; Tre = trehalosa; Leu = leucina; ManSuc = manitol mezclado con sacarosa; ManPBS = manitol en amortiguador PBS; ManPVP = manitol mezclado con PVP; MCTD = manitol-ciclodextrina-trehalosa-dextrano; ManIno = manitol mezclado con inositol; MTDT = manitol-trehalosa-dextrano-tween 80.

Figura 7. La estabilidad de las muestras de secado por pulverización rAd35 a 25°C y 37°C.

10 El estudio de estabilidad del lote de pulverización rAd35 con el MCTD experimental se realizó durante 1 mes tanto a 25°C como a 37°C. El cambio en la actividad del virus se expresa como log pérdida de infectividad del virus por la prueba TCID₅₀. Post-SD = secado después de pulverización.

Descripción

15 Los virus se secan por pulverización con una formulación de manitol-ciclodextrina-trehalosa-dextrano (MCTD) para producir una composición en polvo inmunógena, secada por pulverización, que es adecuada para el suministro por inhalación u otras vías (p. ej., oral, parenteral, intradérmica, sublingual, etc.). Los componentes de la formulación MCTD para el secado por pulverización son los siguientes:

M) Manitol, presente a 50-100 mg/ml

C) Citodextrina, presente a 0,2-1 mg/ml

20 Preferiblemente, la ciclodextrina es β-ciclodextrina; sin embargo, se puede usar α- o γ-ciclodextrina, y también se pueden usar mezclas de ciclodextrinas.

T) Trehalosa, presente a 0,5-5 mg/ml

D) Dextrano, presente a 0,5-5 mg/ml

Preferiblemente, el peso molecular del dextrano es de 25 K a 500 K, y más preferiblemente de 40 K a 90 K.

25 La formulación de MCTD puede incluir agentes amortiguadores (p. ej., L-histidina a 1-20 mM (preferiblemente 5-10 mM) y otros estabilizadores y excipientes.

30 Un contenido a modo de ejemplo del secado previo a la pulverización de la formulación es 100 mg/ml de manitol, 0,2 mg/ml de ciclodextrina, 0,78 mg/ml (5 mM) de histidina, 2 mg/ml de trehalosa y 1 mg/ml de dextrano. El porcentaje de reactivo activo (es decir, el virus (que puede tomar la forma de un vector de la vacuna vírica modificado genéticamente)) en una formulación de secado previo a la pulverización oscilaría entre 1 E⁴/ml y 1 E¹¹/ml, y a menudo de 1 E⁶/ml a 1 E⁸/ml (estando relacionado el contenido del virus con la dosis y dependiendo de la elección del virus), y en una vacuna en polvo final: el intervalo es desde partículas víricas de 1 E⁴/mg a 1 E¹⁰/mg.

35 Como se expone en el ejemplo más adelante, se formuló una vacuna en polvo destinada a la administración en aerosol mediante secado por pulverización de rAd35 con una variedad de antígenos TB con los estabilizadores a base de MCTD manitol mencionados anteriormente. Las propiedades termodinámicas, absorción de agua, distribución del tamaño de partícula y morfología de los polvos se evaluaron y la supervivencia del virus durante el secado por pulverización y el almacenamiento se determinó mediante una dosis infecciosa medio de cultivo histórico (TCID₅₀). El polvo a base de manitol MCTD tenía una distribución estrecha de tamaño con un diámetro medio de volumen de aproximadamente 3,2-3,5 μm (adecuado para la vacunación pulmonar humana de personas) y buenas características de aerosolización. Los polvos secos de pulverización generados a partir de formulaciones a base de MCTD manitol fueron hidrófobos, lo que beneficia la supervivencia del virus tanto durante la producción como el almacenamiento a 4, 25 y 37°C en comparación con las formulaciones higroscópicas (trehalosa, sacarosa, dextrano, PVP, leucina). Los resultados en el ejemplo demuestran que es posible producir, en un proceso de secado por pulverización en una etapa, una formulación en polvo seco estable de, p. ej., una vacuna contra la TB, adecuada para la vacunación masiva.

45 Aunque el polvo de MCTD-virus secado por pulverización está diseñado para su uso por inhalación, debe entenderse que el polvo se puede combinar con excipientes para administración por vía oral, parenteral, intradérmica y otras vías. Los excipientes adecuados son, por ejemplo, agua, solución salina, dextrosa, rafinosa, glicerol, etanol y similares, o una de sus combinaciones. Además, la composición puede contener cantidades menores de sustancias auxiliares tales como agentes humectantes o emulsionantes, agentes amortiguadores del pH y similares. Los preparados de la vacuna de la presente invención (es decir, las composiciones inmunógenas) pueden comprender además un adyuvante, ejemplos adecuados de los cuales incluyen, pero no se limitan a, Seppic, Quil A, Alhydrogel, etc.

Si se desea administrar una forma oral de la composición, se pueden añadir diversos espesantes, aromatizantes, diluyentes, emulsionantes, adyuvantes de dispersión o aglutinantes y similares.

5 La composición de la presente invención puede contener cualquiera de dichos ingredientes adicionales a fin de proporcionar la composición en una forma adecuada para su administración. La cantidad final de virus en las formulaciones puede variar. Sin embargo, en general, la cantidad en las formulaciones será de aproximadamente 1-99 por ciento. Además, los preparados de la presente invención pueden contener un solo tipo de virus o más de un tipo de virus (p. ej., para vacunar contra múltiples enfermedades simultáneamente).

10 En el caso de preparados de vacunas, la presente descripción también proporciona métodos para provocar una respuesta inmunitaria a antígenos codificados por un vector de la vacuna modificado genéticamente, y métodos para vacunar a un mamífero contra enfermedades o afecciones relacionadas con dichos antígenos. Por provocar una respuesta inmunitaria, nos referimos a que la administración del preparado de la vacuna (es decir, la composición inmunógena) de la presente invención provoca la síntesis en los sujetos, después de la administración, de anticuerpos específicos (a un valor en el intervalo de 1 a 1×10^6 , preferiblemente 1×10^3 más preferible en el intervalo de aproximadamente 1×10^3 a aproximadamente 1×10^6 , y aún más preferiblemente mayor que 1×10^6) y/o proliferación celular, medida, p. ej., por incorporación de ^3H timidina. Los métodos implican administrar una composición que comprende el polvo seco por pulverización de MCTD-virus en un vehículo farmacológicamente aceptable a un mamífero (p. ej., aire o un propulsor en el caso de una formulación inhalable). Se reconocerá que el polvo de virus-MCTD puede formularse en preparados de la vacuna que pueden administrarse por cualquiera de los muchos medios adecuados que son bien conocidos por los expertos en la técnica, incluidos, pero sin limitarse a, por inyección, por vía oral, intranasal, por ingestión de un producto alimenticio que contiene el virus, etc. El anfitrión elegido como objetivo es generalmente un mamífero, y puede ser un ser humano, aunque éste no necesita ser siempre el caso, ya que también se contemplan aplicaciones veterinarias.

25 Los virus empleados en la práctica de la invención son virus atenuados adecuados para su uso como vacunas seleccionados de virus poliomielítico, rotavirus, ortomixovirus tales como virus de la gripe, retrovirus tales como RSV, poxvirus tales como vacuna, parvovirus tales como virus adenoasociados, papilomaviridae tales como VHP, herpesvirus tales como EBV, CMV o virus del herpes simple, lentivirus, etc. Preferiblemente, los virus no son replicantes o son deficientes en replicación (es decir, no se replican o se reproducen a baja velocidad).

30 La invención tiene una aplicación especial para vectores de vacunas víricas biotecnológicas atenuadas, elaboradas con microbios vivos de, por ejemplo, adenovirus, poxvirus, virus de Ankara de vacuna modificados (MVA), baculovirus, virus de la estomatitis vesicular biotecnológicos (VSV), etc. El vector de la vacuna vírica puede tomar una variedad de formas diferentes, y preferiblemente se manipularán genéticamente para codificar uno o más genes de interés, es decir, genes viajeros o transgenes. Los genes viajeros son normalmente transgenes heterólogos (genes "extraños") que se originan a partir de otro organismo, tales como otro virus, una bacteria u otro patógeno, y pueden ser de cualquier organismo. Por "gen viajero" debe entenderse no solo a "genes" completos sino a cualquier secuencia que codifique un péptido, polipéptido, proteína o ácido nucleico de interés, es decir, como "gen" completo. por si mismo puede no estar incluido, sino más bien la parte de un gen que codifica un polipéptido o péptido de interés, p. ej., un péptido antigénico. Además, varias otras construcciones pueden ser codificadas por genes viajeros, p. ej. proteínas híbridas, o diversas formas mutantes (ya sean naturales o modificadas genéticamente) de una secuencia de aminoácidos, además, las secuencias de aminoácidos totalmente artificiales que no aparecen en la naturaleza también pueden codificarse. El vector de la vacuna vírica está genéticamente modificado para que contenga uno o más de dichos "genes viajeros", y también puede codificar múltiples copias de cada uno de los genes viajeros. El vector de la vacuna vírica funciona como un vector para transportar el/los gen(es) viajero(s) y/o genes que codifican factores de supresión u otros factores en células anfitrionas que son invadidas por el vector de la vacuna vírica, donde se expresan los productos génicos, es decir, las secuencias génicas son expresables y la transcripción y/o traducción de los productos génicos se produce dentro de la célula anfitriona que es invadida por la bacteria. Las secuencias que codifican los genes viajeros y los genes que codifican los factores de supresión están operativamente (operablemente) unidos a secuencias de control de la expresión, especialmente secuencias de control de la expresión que permiten la expresión dentro de la célula anfitriona eucariota. En algunas realizaciones, si se codifican diversos genes viajeros, cada uno tendrá su propio sistema de control de expresión. En otras realizaciones, un sistema de control de la expresión servirá para dirigir la expresión de más de un gen viajero, p. ej., como un único transcrito con una variedad de secuencias génicas. Asimismo, si se codifican múltiples factores de supresión en un vector de la vacuna vírica, la transcripción de cada uno puede controlarse por separado, o varias secuencias pueden estar bajo el control de una secuencia de control de expresión.

55 En concreto, dichos genes viajeros pueden codificar uno o más péptidos o proteínas que son antígenos, y a los que se desea provocar una respuesta inmunitaria. Los expertos en la técnica reconocerán que existe una amplia variedad de dichos antígenos, incluidos, pero no limitados a, los relacionados con agentes infecciosos tales como diversos virus, bacterias y hongos, etc. Los patógenos víricos, de los que proceden los antígenos víricos, incluyen, pero no se limitan a, Ortomixovirus, como el virus de la gripe (ID taxonómica: 59771; Retrovirus, tales como RSV, HTLV-1 (ID taxonómica: 39015) y HTLV-II (ID taxonómica: 11909), Papillomaviridae tal como VHP (ID taxonómica: 3377043). Herpesvirus tales como ID taxonómica de EBV: 10295; CMV (ID taxonómica: 10358) o virus del herpes simple (ATCC n°: VR-1487); Lentivirus, tales como HIV-1 (ID taxonómica: 12721) y HIV-2 (ID taxonómica: 11709);

Rabdovirus, tal como de la rabia; Picornovirus, tal como Virus poliomiélfítico (ID taxonómica; 12080); Poxvirus, tal como vacuna (ID taxonómica: 10245); Rotavirus (ID taxonómica: 10912); y Parvovirus, tal como virus adenoasociado 1 (ID taxonómica: 85106).

5 Se pueden encontrar ejemplos de antígenos víricos en el grupo incluidos, pero no limitados a, antígenos del virus de la inmunodeficiencia humana Nef (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository, Cat. # 183, Genbank accession # AF238278), Gag, Env (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository Cat. # 2433; Genbank accession # U39362), Tat (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository Cat. # 827; Genbank accession # M13137), derivados mutantes de Tat, tal como Tat-31-45 (Agwale *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 10037; 2002), Rev (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository Cat. # 2088; Genbank accession # L14572) y Pol (National Institute of Allergy and Infectious Disease HIV Repository Cat. # 238; Genbank accession # AJ237568) epítopes de linfocitos T y B de gp120 (Hanke y McMichael, *AIDS Immunol Lett.*, 66:177, 1999); (Hanke, *et al.*, *Vaccine*, 17: 589; 1999); (Palker *et al.*, *J. Immunol.*, 142:3612, 3619; 1989) derivados híbridos de Env y gp120 de HIV-1, tales como, pero no restringidos a la fusión entre gp120 y CD4 (Fouts *et al.*, *J. Virol.* 2000, 74:11427- 11436, 2000); derivados truncados o modificados de env de VIH-1, tal como, pero no restringido a, gp140 (Stamatos *et al.*, *J. Virol.*, 72:9656-9667; 1998) o derivados de env y gp140 de HTV-1 (Binley, *et al.*, *J. Virol.*, 76:2606-2616, 2002); (Sanders, *et al.*, *J. Virol.*, 74:5091-5100 (2000); (Binley, *et al.* *J. Virol.*, 74:627-643; 2000), el antígeno de superficie de la hepatitis B (Genbank accession # AF043578); (Wu *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 85:4726-4730; 1989); antígenos de rotavirus, tal como VP4 (Genbank accession # AJ293721); (Mackow *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 87:518-522; 1990) y VP7 (GenBank accession # AY003871) (Green *et al.*, *J. Virol.*, 62:1819-1823, 1988), antígenos del virus de la gripe tales como hemaglutinina o (GenBank accession # AJ404627) (Pertmer y Robinson, *Virology*, 257:406; 1999); nucleoproteína (GenBank accession # AJ289872); (Lin *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 97:9654-9658; 2000) antígenos del virus del herpes simple tal como timidina cinasa (Genbank accession # AB047378; (Whitley *et al.*, en: *New Generation Vaccines*, páginas 825-854).

25 Los patógenos bacterianos, de los que proceden los antígenos bacterianos, incluyen, pero no se limitan a: *Mycobacterium spp.*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella spp.*, *Shigella spp.*, *E. coli*, *Rickettsia spp.*, *Listeria spp.*, *Legionella pneumoniae*, *Pseudomonas spp.*, *Vibrio spp.*, *Bacillus anthracis* y *Borellia burgdorferi*. En especial, los antígenos de interés de *Mycobacterium tuberculosis* incluyen, pero no se limitan a Rv0079, Rv0101, Rv0125, Rv0170, Rv0198c, Rv0211, Rv0227c, Rv0243, Rv0251c, Rv0282, Rv0283, Rv0284, Rv0285, Rv0286, Rv0287, Rv0288, Rv0289, Rv0290, Rv029, Rv0350, Rv0351 , Rv0383c, Rv0384c, Rv0450c, Rv0467, Rv0468, Rv0503c, Rv0569, Rv0572c, Rv0574c, Rv0588, Rv0628c, Rv0685, Rv0754, Rv0798c, Rv0824c, Rv0847, Rv0867c, Rv0885, Rv1006, Rv1009, Rv1057, Rv1094, Rv1124, Rv1130, Rv1131 , Rv1169, Rv1174c, Rv1182, Rv1186c, Rv1187, Rv1188, Rv1196, Rv1221, Rv1347c, Rv1348, Rv1349, Rv1411c, Rv1436, Rv1461, Rv1462, Rv1464, Rv1465, Rv1466, Rv1477, Rv1478, Rv1594, Rv1594, Rv1636, Rv1733c, Rv1734c, Rv1735c , Rv1736c, Rv1737c, Rv1738, Rv1793, Rv1812c, Rv1813c. Rv1876, Rv1884c, Rv1886c, Rv1908c, Rv1926c, Rv1980c, Rv1986, Rv1996, Rv1997, Rv1998c, Rv2004c, Rv2005c, Rv2006, Rv2007c, Rv2008c, Rv2011c, Rv2028c, Rv2029c, Rv2030c, Rv2031c, Rv2032, Rv2110c, Rv2123, Rv2140c, Rv2182c, Rv2224c, Rv2244, Rv2245, Rv2246, Rv2251, Rv2377c, Rv2378c, Rv2380c, Rv2381c, Rv2382c, Rv2383c, Rv2386c, Rv2389c, Rv2428, Rv2429, Rv2430c, Rv2450c, Rv2457c, Rv2466c, Rv2510c, Rv2515c, Rv2516c, Rv2557, Rv2590, Rv2620c, Rv2621c, Rv2622, Rv2623, Rv2625c, Rv2626c, Rv2627c, Rv2628, Rv2629, Rv2657c, Rv2659c, Rv2660, Rv2710, Rv2744c, Rv2780, Rv2833c, Rv2856, Rv2869c, Rv2875, Rv2930, Rv2999, Rv3126c, Rv3127, Rv3129, Rv3130c, Rv3131, Rv3132c, Rv3133c, Rv3134c, Rv3139, Rv3140, Rv3173c, Rv3229c, Rv3250c, Rv3251c, Rv3283, Rv3290c, Rv3347c, Rv3372, Rv3406, Rv3516, Rv3546, Rv3570c, Rv3593, Rv3597c, Rv3616c, Rv3619c, Rv3660c, Rv3763, Rv3804c, Rv3812, Rv3833, Rv3839, Rv3840, Rv3841, Rv3871, Rv3873, Rv3874, Rv3875, Rv3876, Rv3878 y Rv3879c. (Véase además, la solicitud de patente de Estados Unidos 11/945.680 de Shafferman *et al.* , publicación n° 20090136534, cuyo contenido completo se incorpora en la presente memoria como referencia).

50 Ejemplos de antígenos protectores de patógenos bacterianos incluyen los antígenos somáticos de *E. coli* enterotoxigénica, tales como el antígeno con fimbrias CFA/I (Yamamoto *et al.*, *Infect. Immun.*, 50:925-928, 1985) y la subunidad B atóxica de la toxina lábil al calor (*Infect. Immun.*, 40: 888-893, 1983); pertactina de *Bordetella pertussis* (Roberts *et al.*, *Vacc.*, 10:43-48; 1992), adenilato ciclasa hemolisina de *B. pertussis* (Guiso *et al.*, *Micro. Path.*, 11:423-431; 1991), fragmento C de la toxina tetánica de *Clostridium tetani* (Fairweather *et al.*, *Infect. Immun.*, 58:1323-1326, 1990), OspA de *Borellia burgdorferi* (Sikand *et al.*, *Pediatrics*, 108: 123-128, 2001); (Wallich *et al.*, *Infect. Immun.*, 69: 2130-2136; 2001), proteínas protectoras de la capa superficial paracrística de *Rickettsia prowazekii* y *Rickettsia typhi* (Carl *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:8237-8241, 1990), la listeriolisina (también conocida como "Llo" y "Hly").) y/o la superóxido dismutasa (también conocida como "SOD" y "p60") de *Listeria manocytogenes* (Hess, J., *et al.*, *Infect. Immun.* 65:1286-92, 1997); Hess, J., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 93:1458-1463; 1996); (Bouwer *et al.*, *J. Exp. Med.* 175:1467-71; 1992), la ureasa de *Helicobacter pylori* (Gómez-Duarte *et al.*, *Vaccine* 16, 460-71, 1998); (Corthesy-Theulaz, *et al.* *Infection & Immunity* 66, 581-6; 1998), y el antígeno protector de *Bacillus anthracis* y el dominio de unión al receptor del factor letal (Price, *et al.*, *Infect. Immun.* 69, 4509-4515; 2001).

60 Los patógenos parásitos, de los que se derivan los antígenos parásitos, incluyen, pero no se limitan a: *Plasmodium spp.*, tal como *Plasmodium falciparum* (ATCC #: 31145); *Trypanosoma spp.*, tal como *Trypanosoma cruzi* (ATCC #: 50797); *Giardia spp.*, tal como *Giardia intestinalis* (ATCC #: 30888D); *Boophilus spp.*, *Babesia spp.*, tal como

Babesia microti (ATCC #: 30221); *Entamoeba* spp., tal como *Entamoeba histolytica* (ATCC #: 30015); *Eimeria* spp., tal como *Eimeria maxima* (ATCC # 40357); *Leishmania* spp. (ID taxonómica: 38568); *Schistosoma* spp., *Brugia* spp., *Fasciola* spp., *Dirofilaria* spp., *Wuchereria* spp. y *Onchocerca* spp. (Véase también Solicitud de patente internacional PCT/US09/30734 de Shaffermann *et al.*, cuyos contenidos completos se incorporan en la presente memoria como referencia).

Los ejemplos de antígenos protectores de patógenos parásitos incluyen los antígenos circunsporozoítos de *Plasmodium* spp. (Sadoff *et al.*, *Science*, 240:336-337; 1988), tal como el antígeno circunsporozoíto de *P. berghei* o el antígeno circunsporozoíto de *P. falciparum*; el antígeno de superficie de merozoíto de *Plasmodium* spp. (Spetzler *et al.*, *Int. J. Pept. Prot. Res.*, 43:351-358, 1994); la lectina específica de galactosa de *Entamoeba histolytica* (Mann *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 88: 3248-3252, 1991), gp63 de *Leishmania* spp. (Russell *et al.*, *J. Immunol.*, 140:1274-1278; 1988); (Xu y Liew, *Immunol.*, 84:173-176, 1995), gyp46 de *Leishmania major* (Handman *et al.*, *Vaccine*, 18:3011-3017; 2000) paramiosina de *Brugia malayi* (Li *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 49:315-323, 1991), la triosa-fosfato isomerasa de *Schistosoma mansoni* (Shoemaker *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA, 89:1842-1846, 1992), la proteína globinoide secretada de *Trichostrongylus colubriformis* (Frenkel *et al.*, *Mol. Biochem. Parasitol.*, 50: 27-36, 1992); las glutatión-S-transferasas de *Fasciola hepatica* (Hillyer *et al.*, *Exp. Parasitol.*, 75:176-186, 1992), *Schistosoma bovis* y *S. japonicum* (Bashir *et al.*, *Trop. Geog. Med.*, 46:255-258, 1994); y KLH de *Schistosoma bovis* y *S. japonicum* (Bashir *et al.*, anteriormente, 1994).

El vector de la vacuna vírica también puede modificarse genéticamente para expresar secuencias de ácido nucleico que codifican una o más proteínas que interfieren con las respuestas de interferón (IFN) de tipo I de células anfitrionas de mamífero. Ejemplos de proteínas que modulan la respuesta de IFN tipo I incluyen la proteína 1 no estructural (NSP-1) del rotavirus, la proteína NS1 del virus de la gripe y C12R del virus de ectromelia. Además, otras proteínas moduladoras de IFN adecuadas incluyen, pero no se limitan a: Ebola VP35 (la proteína VP35 del virus del Ébola funciona como un antagonista de IFN de tipo I. C.F. Basler, X. Wang, E. Mühlberger, V. Volchkov, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2000. National Acad. Sciences); Vacuna B18R (Waibler *et al.*, *Journal of Virology*, Feb. 2009; 83(4):1563-71); la fosfoproteína P de la rabia (Krzysztof Brzózka, *et al. Journal of Virology*, marzo de 2006, págs. 2675-2683. vol. 80, nº 6); nucleoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML) (Martínez-Sobrido Luis *et al.*, *Journal of Virology* 2006; 80(18):9192-9); y la proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C (VHC) (Xiao-Dong Li, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 6 de diciembre 2005; 102(49): 17717-17722). Además, Weber y Haller (*Biochemie* 89, 2007, 836-842) describen otros ejemplos de proteínas adecuadas tales como la proteína E3L de poxvirus, la proteína sigma3 de los reovirus, la proteína US11 del virus del herpes simple y las proteínas m142 y m143 del citomegalovirus marino.

Alternativamente, puede desearse provocar una respuesta inmunitaria a antígenos que no están relacionados con agentes infecciosos, por ejemplo, antígenos relacionados con células cancerosas, enfermedad de Alzheimer, diabetes tipo 1, enfermedad cardíaca, enfermedad de Crohn, esclerosis múltiple, etc. Los vectores de la vacuna vírica de la presente invención también pueden ser modificados por ingeniería genética con uno o más genes viajeros que codifican estos tipos o antígenos.

Además, los genes viajeros que son transportados por el vector de la vacuna vírica no necesitan codificar antígenos, pero pueden codificar cualquier péptido o proteína de interés. Por ejemplo, los métodos de la invención pueden usarse para la administración de moléculas viajeras para la corrección de trastornos hereditarios, p. ej., los vectores pueden usarse en genoterapia. Dichos genes incluirían, por ejemplo, la sustitución de genes defectuosos tales como el gen regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis cística (CFTR) para la fibrosis cística; o la introducción de nuevos genes tales como el gen complementario de integrasa para el tratamiento del VIH; o genes para potenciar las respuestas de linfocitos T de tipo IT tales como la interleucina-27 (IL-27); o genes para modular la expresión de determinados receptores, metabolitos u hormonas tales como de colesterol y receptores de colesterol o de insulina y receptores de insulina; o genes que codifican productos que pueden destruir células cancerosas tales como el ligando inductor de apoptosis relacionado con el factor de necrosis tumoral (TNF) (TRAIL); o una proteína osteoprotegerina (OPG) natural que inhibe la resorción ósea; o para expresar eficientemente anticuerpos humanizados completos, por ejemplo, anticuerpo monoclonal humanizado que actúa sobre el receptor HER2/neu (erbB2) en células cancerosas.

Además, los genes viajeros pueden codificar ARN inhibidores tales como ARNsi "inhibidores pequeños". Como es sabido en la técnica, dichos ARN son complementarios a un ARNm de interés y se unen al ARNm y evitan la traducción del mismo, p. ej., como un medio de evitar la expresión de un producto génico.

Preferiblemente, el vector de la vacuna vírica se modificará genéticamente para expresar una o más proteínas (es decir, antígenos) o una proteína de fusión de varios antígenos que, cuando se administra a un sujeto (p. ej., un ser humano u otro animal (p. ej., mamífero), provocará una respuesta inmunitaria a una o más infecciones, p. ej., tuberculosis (TB), paludismo, VIH, dengue, etc.

La construcción de vectores de vacunas víricas es bien conocida en la técnica. Generalmente, los genes que se colocan en el vector de vacuna vírica mediante ingeniería genética están bajo control de una secuencia de expresión tal como un activador, punto interno de entrada ribosómica (IRES), diversas secuencias potenciadoras, etc. Dichas secuencias y activadores pueden estar naturalmente dentro del vector de la vacuna vírica (es decir, natural para el

virus, p. ej., adenovirus), y las secuencias de interés colocadas en un lugar tal que su expresión está dirigida por las secuencias víricas naturales. Alternativamente, los activadores de organismos distintos del vector de la vacuna vírica (p. ej., adenovirus) pueden clonarse en el virus, junto con el (los) gen(es) de interés. Los ejemplos de activadores que pueden utilizarse de este modo en la práctica de la invención incluyen, pero no se limitan a, diversos activadores víricos, procariotas o eucariotas, p. ej. Activadores de citomegalovirus (CMV), activador del mosaico de la coliflor, activadores víricos de la gripe y del VIH, activadores del choque térmico (p. ej. Activador hsp60) y otros activadores de *M. tuberculosis*, etc. De estos, se pueden utilizar activadores tanto constitutivos como inducibles.

Ejemplo

Resultados

10 *Tamaño de partícula del virus de la vacuna*

Para los experimentos, se utilizó una partícula de adenovirus biotecnológico (rAd35) que expresaba un gran número de antígenos de TB. rAd35 induce niveles bajos de anticuerpos neutralizantes en primates no humanos que son un modelo importante para ensayos preclínicos de vacunas ya que son sensibles a la infección por *Mtb* y desarrollan características clínicas y una patología que se asemeja mucho a la TB en humanos (véase, Nanda *et al.* 2005) *J. Virol.* 79: 14161-14168, y McMurray D.N. (2000) *Clin. Infect. Dis.* 30 Supl. 3: S210-212) Como se indicó anteriormente, se puede usar una variedad de diferentes virus, y una variedad de diferentes antígenos, factores y otras secuencias de nucleótidos se pueden codificar en una partícula de vacuna vírica tal como rAd35. El pico principal de distribución de tamaño del rAd35 probado en la curva centrífuga del discos fue de aproximadamente 77 nm (Figura 1). Hubo un pico más pequeño del tamaño del virus de 65 nm. Los dos picos no cambiaron incluso cuando la mayor parte del material del virus se concentró 10 veces (datos no mostrados).

Propiedades termodinámicas

Las temperaturas de transición vítrea de los polvos secantes se determinaron después de la producción y después del almacenamiento a alta humedad. El polvo a base manitol (MCTD) tenía el valor mayor de T_g de 97,09°C, con un punto de fusión de 166,53°C para el componente de manitol cristalino (Figura 2A) La T_g de polvo de trehalosa después del secado por pulverización fue de 50,55°C (Figura 2B). El manitol solo no tuvo una T_g , y el manitol con polvo de PVP tuvo una T_g de 85,78°C. Las curvas termodinámicas y las temperaturas de transición vítrea de polvos de pulverización representativos se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1. Características de diferentes polvos de secado por pulverización

Fórmula	T_g (°C)	Rendimiento ⁽¹⁾ (%)	d (0,5) ⁽²⁾ (VMD)	Contenido de humedad ⁽³⁾ (%)
Manitol	-	30,0	3,1	1,28
Manitol con PVP	85,78	19,9	7,0	1,94
Trehalosa	50,55	6,0	2,6	5,40
Leucina	-	4,3	-	1,64
35 MCTD	97,09	35,3	3,2	1,45

(1) El rendimiento en polvo se calculó por el peso/peso del sólido antes y después del secado por pulverización. La cantidad total de sólido antes del secado por pulverización se determinó a partir del peso de liofilización de la mezcla de secado antes de la pulverización.

(2) d (0,5) es el tamaño de partícula a $D(v,50)$, que es el diámetro de volumen equivalente al 50% del volumen acumulado. El tamaño de partícula de los polvos se describió por el diámetro medio del volumen (VMD).

(3) Los contenidos de humedad residual se evaluaron por un Karl Fischer TIM550 (Radiómetro analítico) en una caja seca, los porcentajes de agua resultantes se expresaron en peso/peso.

Distribución del tamaño de partículas y polidispersidad

El secado por pulverización de la formulación de MCTD produjo un polvo fino con un intervalo de tamaño de partícula promedio de $D(v,50) = 3,2 \sim 3,5 \mu\text{m}$. Combinado con $D(v, 0,1)$ y $D(v, 0,9)$, la longitud fue de alrededor de 1,5 μm . El porcentaje de partículas inhalables [IP, 1 $\mu\text{m} < \text{IP} < 5 \mu\text{m}$] podría alcanzar el 72,6% del total de partículas, y la mayoría de los polvos son esféricos (Figuras 3 y 4A) (se reconoce que el polvo se puede proporcionar a un sujeto por otras vías además de la inhalación). El polvo secado por pulverización utilizando la formación de MCTD no tuvo una distribución diferente ni propiedades termodinámicas en las pruebas con rAD35 y placebo (datos no mostrados). La formulación de manitol con PVP tenía un tamaño de polvo seco de $D(v, 50) = 7,0 \mu\text{m}$ y el producto de trehalosa

tenía un $D(v, 50) = 2,6 \mu\text{m}$ (Tabla 1). Aunque la formulación de trehalosa tenía un tamaño de partícula más pequeño después del secado por pulverización (Tabla 1 y Figura 4B), el polvo de trehalosa se aglomeró fácilmente tras la exposición a alta humedad, y el tamaño de partícula pudo aumentar significativamente lo que no era adecuado para la medición por difracción de láser. MCTD, sin embargo, no presentó ninguna disminución detectable en $IP < 5 \mu\text{m}$, incluso tras el almacenamiento a 37°C durante 28 días (los resultados fueron los mismos que se muestran en la figura 3).

Contenido de humedad y desplazamiento de la temperatura de transición vítrea

Para comparar las variaciones del contenido de humedad bajo alta humedad (70%) de diferentes formulaciones, se seleccionaron cuatro polvos representativos preparados a partir de formulaciones de placebo en las mismas condiciones de tratamiento. Los contenidos de agua de los polvos después del secado por pulverización fueron: Manitol 1,28%; Manitol con PVP 1,94%; Trehalosa 5,40% y MCTD 1,45% (Tabla 1). La tendencia a la absorción del agua fue diferente entre las formulaciones a base de trehalosa y manitol (Figura 5) Después de 2 horas a una humedad del 70%, el contenido de agua del polvo de trehalosa aumentó un 61% (desde 5,40 a 8,70%, p/p) y después de 4 horas, el polvo de trehalosa absorbió un 37% más de agua. El peso total del agua aumentó 120,9% (desde 5,40 a 11,93%). La etapa de saturación de humedad se produjo después de 4 horas para el polvo de trehalosa. Las formulaciones a base de manitol (manitol, manitol con PVP y MCTD) tenían alta resistencia a la absorción de agua. El manitol solo no aumentó el contenido de humedad durante 6 horas bajo exposición a alta humedad, y el polvo de MCTD solo aumentó desde 1,45 a 1,80% el contenido de agua durante este período.

Después de la exposición a alta humedad del 70%, la T_g de polvo a base de manitol (MCTD) no presentaba cambio significativo en 6 h. El polvo de trehalosa, sin embargo, presentaba diferencia aparente en las propiedades termodinámicas: en primer lugar, después de 2 h de exposición a alta humedad, su T_g disminuyó a $38,76^\circ\text{C}$ y luego, después de 4 y 6 h el punto de fusión se redujo a alrededor de 102°C (Figura 2B), y el polvo expuesto apareció cristalizado.

Recuperación y estabilidad de diferentes lotes de pulverización

El efecto del secado por pulverización sobre la infectividad de rAd35 en 10 formulaciones diferentes se muestra en la figura 6, donde el valor antes del secado se compara con el valor después del secado por pulverización. Los cambios de valor se expresaron en log pérdida por gramo de sólido o polvo. La cantidad total de sólido de secado antes de la pulverización era del peso de la liofilización de la mezcla de secado antes de la pulverización.

Todas las formulaciones excepto MCTD experimentaron al menos un 1,5 (máximo 4,9) de log pérdida de actividad vírica. Para la formulación de MCTD, la pérdida en el valor de virus después del secado por pulverización fue solo de 0,83 log. Las disminuciones mayores en la actividad del virus mediante la prueba de dosis infecciosa media de cultivo de tejido ($TCID_{50}$) fueron para las formaciones de trehalosa y leucina. Aunque la adición de sacarosa, inositol o PVP, o la adición de amortiguador PBS podrían aumentar la supervivencia del virus durante el proceso de secado por pulverización, la $TICD_{50}$ de rAd35 vivo era todavía superior a 1 log disminuyó al final de la preparación. La mayoría de las formulaciones también dieron lugar a un bajo rendimiento a menos del 10%, mientras que las formulaciones a base de manitol podrían alcanzar más del 30% de rendimiento sólido al final del proceso de secado por pulverización (datos parciales mostrados en la Tabla 1).

El estudio de estabilidad de las muestras de pulverización de rAd35 utilizando la formulación MCTD demostró que podían almacenarse a 4 y 25°C durante 12 meses sin cambios significativos en el valor de $TCID_{50}$. Después del almacenamiento a 37°C durante cinco semanas, la pérdida de la actividad del virus fue de solo 0,12 log (Figura 7).

Exposición

Los excipientes estabilizantes se usan antes del secado por pulverización para evitar la degradación durante el tratamiento y el almacenamiento. Los disacáridos se encuentran entre los excipientes más frecuentemente utilizados, siendo la trehalosa una selección especialmente frecuente (véase, Maa Y.F., *et al.*, (1999) *Pharmaceutical Research* 16: 249-254; Tzannis S.T., *et al.* (2000) *J. Pharm. Sci.* 88:360-370; Burger J.L., *et al.* (2008) *J. Aeros. Med. Pulmon Drug Deliv.* 21: 25-34; Corbaniea E.A., *et al.*, (2007) *Vaccine* 25:8306-8317; Broadhead J., *et al.* (1994) *J. Pharm. Pharmacol.* 46:458-67; Labrude P. *et al.* (1989) *J. Pharm. Sci.* 78:223-239; y Bosquillon C., *et al.* (2001) *J. Pharm. Sci.* 90:2032-2041). Sin embargo, los polvos a base de trehalosa y sacarosa son más higroscópicos, recogiendo humedad durante la manipulación en el entorno de laboratorio lo que conduce a la degradación en las propiedades físicas de los polvos y reduce la facilidad de dispersión. La sensibilidad de los polvos a la absorción de humedad es importante porque las propiedades físicas de los aerosoles en polvos secos inhalables dependen en gran medida del contenido de humedad; demasiada agua puede causar aglomeración de partículas, lo que reduce la capacidad respiratoria.

Las formulaciones a base de leucina y manitol son las menos higroscópicas. El manitol es estable en forma de polvo y resiste la reabsorción de humedad a humedades relativamente altas. Estas características la convierten en una sustancia ideal a encapsular para inhalación, con fines de diagnóstico y terapéuticos (véase, NYK, Chan HK (2002) *J. Pharm. Pharmaceut. Sci.* 5(2): 162-168; Burger J.L. *et al.*, (2008) *J. Aeros. Med. Pulmon Drug Deliv.* 21: 25-34; Corbaniea E.A., *et al.* (2007) *Vaccine* 25:8306-8317; Bosquillon C., *et al.* (2001) *J. Pharm. Sci.* 90:2032-2041; Glover

W., *et al.* 2006 *Journal of aerosol medicine* 19: 522-532; y Costantino H.R. *et al.* (2000) *J. Pharm. Sci.* 87: 1406-1411). La inhalación de manitol solo en polvo seco produce un marcado aumento en MCC (eliminación mucociliar) en todo el pulmón derecho y en todas las regiones pulmonares tanto en sujetos asmáticos como sanos (véase, Glover W., *et al.*, 2006 *Journal of aerosol medicine* 19: 522-532; Daviskas E., *et al.* (1997) *Eu. Respir. J.* 10: 2449-2454; Daviskas E., *et al.* (1999) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 159:1843-1848; Daviskas E., *et al.* (2001) *Chest* 119:414-421; Daviskas E., *et al.* (2005) *Respirology* 2005: 46-56; y Anderson S.D., *et al.* (1997) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 758-765). La inhalación de manitol en polvo seco fue bien tolerada por todos los pacientes y produjo solo una tos leve que se reprodujo en el día del control (véase, Glover W., *et al.*, 2006 *Journal of aerosol medicine* 19: 522-532 y Anderson S.D., *et al.* (1997) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 156: 758-765). Esto aumenta la ventaja de utilizar una formulación de secado por pulverización a base de manitol en el desarrollo de vacunas en forma de polvo. Con las condiciones de tratamiento utilizadas en el presente estudio, el contenido de humedad de la formulación a base de trehalosa fue mayor que el de las demás formulaciones probadas, mientras que las formulaciones a base de manitol resistieron la absorción de agua, incluso cuando se expusieron a condiciones de alta humedad, lo que beneficiará a las aplicaciones en almacenamiento de vacunas y ensayos clínicos.

La temperatura de transición vítrea de las formulaciones secas también depende en gran medida del contenido de agua; sólo un pequeño aumento de porcentaje en el contenido de agua de las formulaciones con azúcar puede disminuir la T_g en varias decenas de grados Celsius (véase, Corbaniea E.A., *et al.* (2007) *Vaccine* 25:8306-8317). Un mayor contenido de humedad también da como resultado una disminución de la estabilidad vírica (véase, Burger J.L., *et al.* (2008) *J. Aeros. Med. Pulmon Drug Deliv.* 21: 25-34, y Corbaniea E.A., *et al.* (2007) *Vaccine* 25:8306-8317). Se cree que la inmovilización de los materiales lábiles en vidrio amorfo es ventajosa para mantener la actividad de las moléculas incorporadas (véase, Imamura K. *et al.* (2001) *J. Pharm. Sci.* 90:1955-1963) La resistencia a la cristalización puede evaluarse midiendo la temperatura de transición vítrea, que es la temperatura a la que se produce la transición del estado vítreo al gomoso o desde una movilidad molecular baja a una movilidad molecular elevada (y, por lo tanto, mayor riesgo de cristalización). Se sabe que PVP y albúminas aumentan la temperatura de transición vítrea, lo que significa que las formulaciones pueden exponerse a temperaturas ambientales más altas antes de que se produzca la transición vítrea (véase, Corbaniea E.A., *et al.* (2007) *Vaccine* 25: 8306-8317; Mahlin D., *et al.* (2006) *Int. J. Pharm.* 321: 78-85, y Zhang J., *et al.* (2001) *J. Pharm. Sci.* 90:1375-1385) Sin embargo, la PVP como estabilizador en la formulación probada no parecía evitar la pérdida de la actividad del virus durante el proceso de secado por pulverización.

También se ha demostrado que el dextrano evita la cristalización de excipientes secados por pulverización y liofilizados. Por lo tanto, la formulación a base de manitol utilizada en el presente estudio, MCTD, incluye dos tipos de dextrano como componentes. Esta formulación podría aumentar la temperatura de transición vítrea de la trehalosa desde 50,55 a 97,09°C. La formulación también genera un polvo seco que inhibe la recristalización de azúcares estabilizantes, evitando la inactivación de materiales lábiles incorporados, y su temperatura de transición vítrea no disminuye durante el almacenamiento a alta humedad. Igual de importante es la baja higroscopicidad en la selección de la formulación, ya que se sabe que las moléculas de agua aumentan la movilidad molecular, es una temperatura de transición vítrea alta y no cambiante durante el almacenamiento. Con la temperatura de transición vítrea de las formulaciones que se produce a aproximadamente 50°C y más altas, los polvos y micropartículas deben ser físicamente estables a temperaturas de hasta aproximadamente 40°C, siempre que los polvos estén protegidos contra la entrada de humedad. Como se mencionó anteriormente, la formulación de MCTD no presentaba una disminución detectable en IP <5 µm después del almacenamiento a 37°C durante 28 días. Los valores de T_g más altos medidos para esta formulación sugieren que puede ser posible una estabilidad térmica mejor a largo plazo.

Estos resultados demuestran que MCTD es un buen candidato tanto para selecciones de virus vivos como de placebo. MCTD no solo es propicio para formar micropartículas fácilmente dispersas en el tratamiento en seco, sino que también parece ser una buena formulación estabilizadora para el virus del vector de la vacuna rAd35. Las combinaciones de estabilizadores de azúcar de pequeño y alto peso molecular ayudan a conseguir un tratamiento vírico optimizado y estabilidad al almacenamiento, al tiempo que mitigan las propiedades negativas de formación de partículas de la trehalosa. Las demás formulaciones probadas no conservaron la actividad tan bien como la formulación de MCTD durante el proceso de secado por pulverización, o a 37°C en la prueba de estabilidad de 1 mes.

Materiales y métodos

Productos químicos

La leucina se compró en Spectrum, Gardena, CA; manitol, sacarosa, histidina, trehalosa fueron de J.T. Baker, Phillipsburg, NJ; El dextrano (P.M. 60.000-90.000) fue de MP Biomedicals, Solon, OH; β-ciclodextrina fue de TCI-GR, Kita-Ku, Tokio, Japón; la polividona (PVP, P.M. 8.000, K16-18) fue de ACROS, NJ; el inositol se compró en EMD, Gibbstown, NJ.

Centrifuga de discos CPS

El tamaño del virus de la vacuna rAd35 se midió mediante centrifuga de discos CPS (CPS Instruments, Inc., Stuart, Florida). Se usó sacarosa (8% y 24%) en amortiguador de muestra para soluciones en gradiente. Se instaló el programa informático CPSV95 para la recopilación de datos, análisis y control del proceso. La velocidad máxima se seleccionó a 24.000 rpm. El volumen total de inyección para cada análisis fue de 100 µl. Para la calibración se usó una solución de PVC (20%, v/v) 0,377 Micro Calibration Standard.

Secado por pulverización

Los polvos de secado por pulverización se generaron con un Büchi Mini Spray Dryer B-290. El nitrógeno se usó como gas de secado y pulverización. Se prepararon diez soluciones de alimentación diferentes: manitol; trehalosa; leucina; manitol mezclado con leucina, sacarosa, PVP o inositol; manitol en amortiguador PBS; manitol-ciclodextrina-trehalosa-dextrano (MCTD) y manitol-trehalosa-dextrano-tween 80 (MTDT). Excepto leucina usando 0,5%, las formulaciones se basaron en 10% de sólidos de volumen total. Se usaron formulaciones con las mismas concentraciones sin rAd35 para las pruebas con placebo. La temperatura de entrada se ajustó en 65 a 125°C y el caudal del gas de secado en 439 a 538 l/h dando como resultado una temperatura de salida de 34 a 50°C. El caudal del aspirador fue de 35 m³/h. El proceso de secado por pulverización y la subsiguiente alicuotación del polvo se llevaron a cabo en una campana BioProtect II (The Baker Co.). Para minimizar tanto la polimerización microbiana ambiental al polvo como las partículas de polvo pequeñas liberadas al ambiente, el secador por pulverización se ensambló con un filtro de salida de PTFE y un filtro EMFLON de 0,2 µm (Pall Life Sciences, EE. UU.) instalado en la línea de aire comprimido.

Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El comportamiento termodinámico de los polvos se determinó en un DSC 823^o (METTLER TOLEDO, Suiza). La cubierta del crisol que contenía la muestra de polvo se perforó con un pequeño orificio antes del análisis. La muestra (alrededor de 10 mg de polvo) se calentó de 25°C a 170°C con una velocidad de barrido de 10,0°C/min. La celda de muestra se purgó con un gas nitrógeno de 10,0 ml/min. La temperatura de transición vítrea (T_g) se reconoció en la curva de flujo térmico invertida como un cambio endotérmico de los valores iniciales y se determina como el punto medio de esta transición por un programa informático STAR@SW9.01 (METTLER).

Distribución del tamaño de partícula, polidispersidad y morfología

Las distribuciones del tamaño de partícula se midieron por difracción de láser (Mastersizer 2000, Malvern, Wores, Reino Unido). La polidispersidad del polvo fue expresada por la longitud. Longitud = $[D(v, 90) - D(v, 10)]/D(v, 50)$, donde $D(v, 90)$, $D(v, 10)$ y $D(v, 50)$ son los diámetros de volumen equivalente a 90, 10 y 50% del volumen acumulado, respectivamente. El tamaño de partícula de los polvos primarios se describió por el diámetro medio en volumen (VMD), que está relacionado en el diámetro medio másico (MMD) por la densidad de las partículas (suponiendo una densidad independiente del tamaño para las partículas). Se usó un microscopio (Axioskop 40, ZEISS) para examinar la morfología de las partículas de polvos secados por pulverización. Los polvos de manitol se volvieron a poner en suspensión en metanol anhidro a aproximadamente 20 mg/ml. Se colocó una gota de esta suspensión en un portaobjetos limpio de microscopio. Después de 2 minutos, el portaobjetos se examinó con el objetivo de inmersión en aceite ($\times 100$) y un ocular de $10 \times$. Se encontró que la resuspensión de polvo de trehalosa en metanol no era práctica debido a su alta solubilidad. Para la trehalosa, se modificó el método de Tracy *et al.* (Tracy P.H., Hetrick J.H., Karenke W.A. (1951) *J. Dairy Sci.* 34(6): 583-592) de la siguiente manera: se mezclaron aproximadamente 20 mg de polvo con 1 ml de aceite Halocarbon 0.8 y una gota de la suspensión se examinó en un cubreobjetos.

Ensayo de TCID₅₀

Los valores de virus Ad35 en las soluciones de alimentación originales y en los polvos correspondientes se determinaron por valoración en pruebas TCID₅₀. El valor de TCID (dosis infecciosa de cultivo hístico) se determinó mediante la mayor dilución a la que se observaron efectos citopáticos (CPE) en células de retinoblastos embrionarias humanas (HER: 911 células) en un ensayo de TCID 50. En resumen, las 911 células se cultivaron en un matraz de 75 cm² que contenía medio Eagle modificado de Dulbecco enriquecido con 10% de suero fetal bovino y antibióticos (penicilina y estreptomina). Cuando las células fueron confluentes, las células se separaron usando solución de tripsina-EDTA y la concentración celular se ajustó a 4×10^5 células/ml. La suspensión celular (100 µl) se sembró en una o dos placas de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pocillos y se incubó a 37°C con 10% de CO₂ durante 4 h. Una vez se unieron las células, se eliminó el medio y se distribuyeron 160 µl de medio en todos los pocillos. Luego se añadieron 40 µl de cada virus diluido previamente a 8 pocillos en la primera columna y posteriormente se realizó una dilución en serie de 5 veces en las placas para diluciones que oscilaban de 10^{-1} a 10^{-11} o de 10^{-7} a 10^{-17} , dependiendo del valor esperado, y las placas se incubaron durante 14 días. El CPE se calificó el día 14 y el valor del virus se determinó empleando la fórmula de Spearman-Kärber de la siguiente manera.

$$\text{LogTCID}_{50}/100 \mu\text{l} = X_0 - (d/2) + (d/n) \sum X_i$$

Donde " X_0 " es el log₁₀ del recíproco de la dilución mayor a la que todas las columnas de prueba son positivas a CPE, " d " representa el valor log₁₀ del factor de dilución ($d = 0,699$ para el factor de dilución de 5 veces) y " n " es el

número de pocillos para cada dilución. " Σx_i " es la suma de todos los pocillos que dan CPE, a partir de la dilución " X_0 ", incluido CPE de dilución " X_0 ". El valor del valor resultante se ajustó para las diluciones iniciales y se publicó como TCID₅₀/ml.

Valoración de Karl Fischer

- 5 El contenido de humedad residual después del secado por pulverización y el contenido de agua después de 2 a 6 horas de almacenamiento en una caja de humedad (70%, detector de humedad de VWR, EE. UU.), se evaluaron mediante un TIM550 Karl Fischer (Radiometer Analytical) en una caja seca. Las muestras (± 30 mg) se se volvieron a poner en suspensión en metanol anhidro absoluto (Phillipsburg, NJ). Después de la fondo de la espera general, la valoración comenzó automáticamente. Durante esta valoración, las moléculas de agua reaccionan estequiométricamente con el reactivo AQUA STAR[®] CombiTitrant 5 (EMD); posteriormente, el volumen de CombiTitrant 5 utilizado para alcanzar el punto final de la valoración se usa para calcular el porcentaje de agua presente en la muestra (1 ml de CombiTitrant 5 = 5 mg de agua). Todas las valoraciones se realizaron por triplicado.
- 10

REIVINDICACIONES

1. Una composición inmunógena, que comprende:
 - 5 uno o más virus vivos en una formulación en polvo secados por pulverización de una composición que comprende 50-100 mg/ml de manitol, 0,2-1 mg/ml de ciclodextrina, 0,5-5 mg/ml de trehalosa y 0,5-5 mg/ml de dextrano, en donde el virus es un virus atenuado adecuado para su uso como vacuna seleccionado de virus poliomiélfítico, rotavirus, ortomixovirus, incluidos los virus de la gripe, retrovirus incluyenidos RSV, poxvirus, incluidas vacunas, parvovirus incluidos virus adenoasociados, papilomaviridae, incluido el VHP, herpesvirus incluido EBV, CMV o virus del herpes simple, lentivirus.
- 10 2. La composición inmunógena de la reivindicación 1, en donde dicha ciclodextrina incluye una o más de α - o β - o γ -ciclodextrina.
3. La composición inmunógena de la reivindicación 1, en donde dicho dextrano tiene un peso molecular que oscila entre 25 K y 500 K.
4. La composición inmunógena de la reivindicación 3, en donde dicho dextrano tiene un peso molecular que oscila entre 40 K y 90 K.
- 15 5. La composición inmunógena de la reivindicación 1 que comprende adicionalmente agentes amortiguadores.
6. La composición inmunógena de la reivindicación 1 en donde dicho uno o más virus incluye al menos un virus que es un vector de la vacuna vírica modificado genéticamente que codifica uno o más genes viajeros que son extraños para dicho vector de la vacuna vírica modificado genéticamente, preferiblemente en donde dicho vector de la vacuna vírica no es replicante o presente replicación insuficiente, en especial, en donde dicha vacuna vírica es un adenovirus.
- 20 7. La composición inmunógena de la reivindicación 6, en donde dicho vector de la vacuna vírica incluye secuencias de ácido nucleico que codifican una o más proteínas que interfieren con las respuestas del interferón (IFN) tipo I de células anfitrionas de mamífero seleccionadas de la proteína 1 no estructural de rotavirus, proteína NS1 del virus de la gripe, C12R del virus de la ectromelia, Ebola VP35, Vacuna B18R, nucleoproteína del virus de la coriomeningitis linfocítica (VCML), proteasa NS3/4A del virus de la hepatitis C (VHC), proteína E3L de poxvirus, proteína sigma3 de reovirus, proteína US11 del virus del herpes simple y proteínas m142 y m143 del citomegalovirus murino.
8. La composición inmunógena de la reivindicación 6, en donde dicho vector de la vacuna vírica expresa uno o más antígenos víricos, bacterianos o parasitarios de dichos uno o más genes viajeros.
9. La composición inmunógena de la reivindicación 6, en donde dichos uno o más genes viajeros expresan uno o más antígenos de la tuberculosis.
- 30 10. La composición inmunógena de la reivindicación 6, en donde dichos uno o más genes viajeros expresan uno o más antígenos del paludismo.
11. La composición inmunógena de la reivindicación 6, en donde dichos uno o más genes viajeros expresan uno o más antígenos del VIH.
- 35 12. La composición inmunógena de la reivindicación 1, en donde dicha formulación en polvo tiene un diámetro de volumen medio de 3,2-3,5 μm .
13. Un método para formar una composición inmunógena, que comprende:
 - 40 secar por pulverización uno o más virus vivos de una composición que comprende 50-100 mg/ml de manitol, 0,2-1 mg/ml de ciclodextrina, 0,5-5 mg/ml de trehalosa y 0,5-5 mg/ml de dextrano para formar un polvo secado por pulverización que contiene dicho uno o más virus vivos, en donde el virus es un virus atenuado adecuado para su uso como una vacuna seleccionada del virus poliomiélfítico, rotavirus, ortomixovirus incluido el virus de la gripe, retrovirus incluido el RSV, poxvirus, incluidas las vacunas, parvovirus incluidos los virus adenoasociados, papilomaviridae, incluido el VHP, herpesvirus incluidos EBV, CMV o el virus del herpes simple, lentivirus.
- 45 14. El método de la reivindicación 13, en donde dicho uno o más virus incluyen al menos un virus que es un vector de la vacuna vírica modificado genéticamente que codifica uno o más genes viajeros que son extraños a dicho vector de la vacuna vírica modificado genéticamente, preferiblemente en el que dicha vacuna vírica no es replicante o es insuficiente en replicación, en especial en donde dicho vector de la vacuna vírica es un adenovirus.
- 50 15. El método de la reivindicación 14, en donde dicho vector de la vacuna vírica expresa uno o más antígenos víricos, bacterianos o parasitarios de dichos uno o más genes viajeros, en especial en donde dichos uno o más genes viajeros expresan uno o más antígenos de la tuberculosis, antígenos del paludismo o antígenos del VIH.

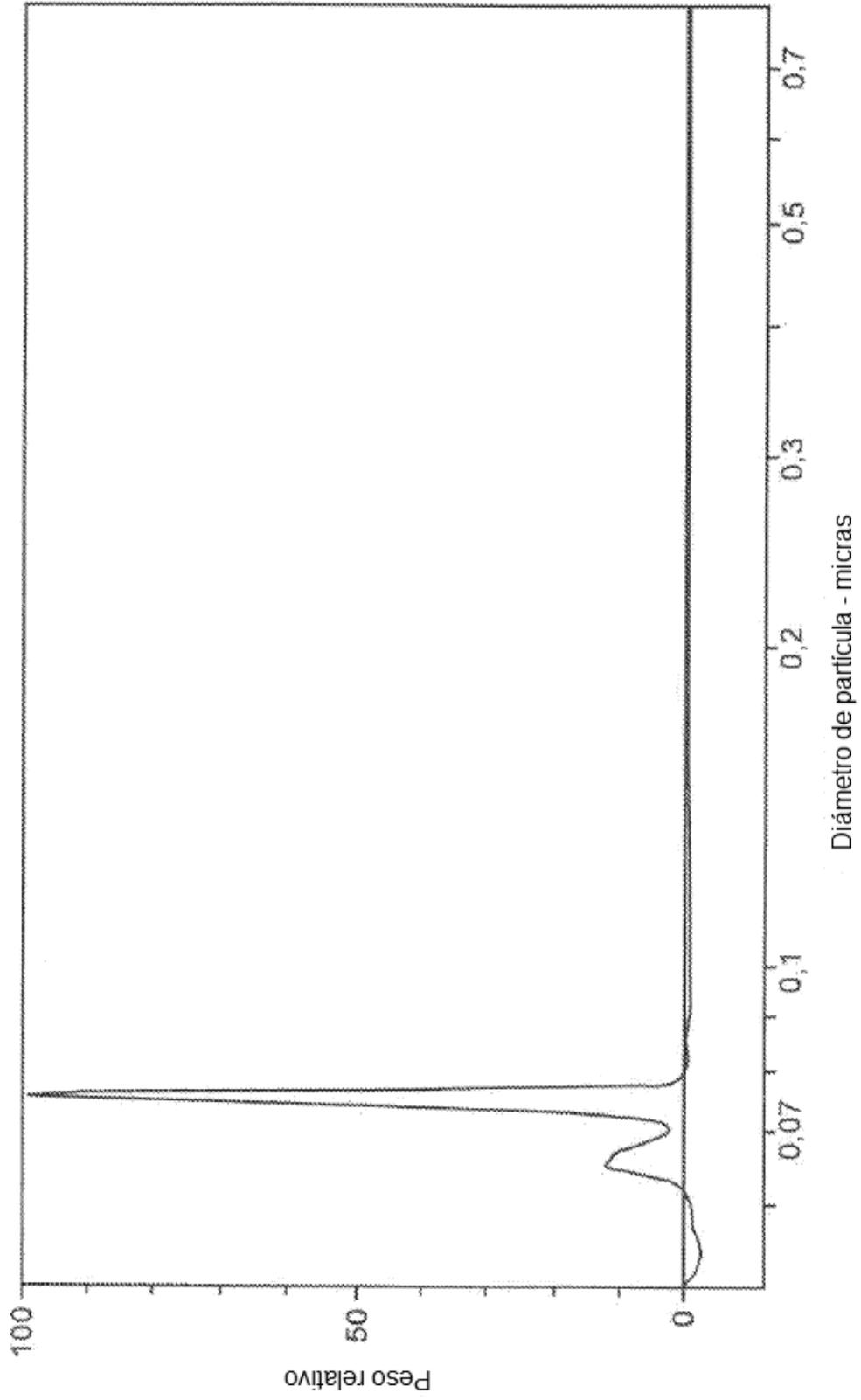


Figura 1

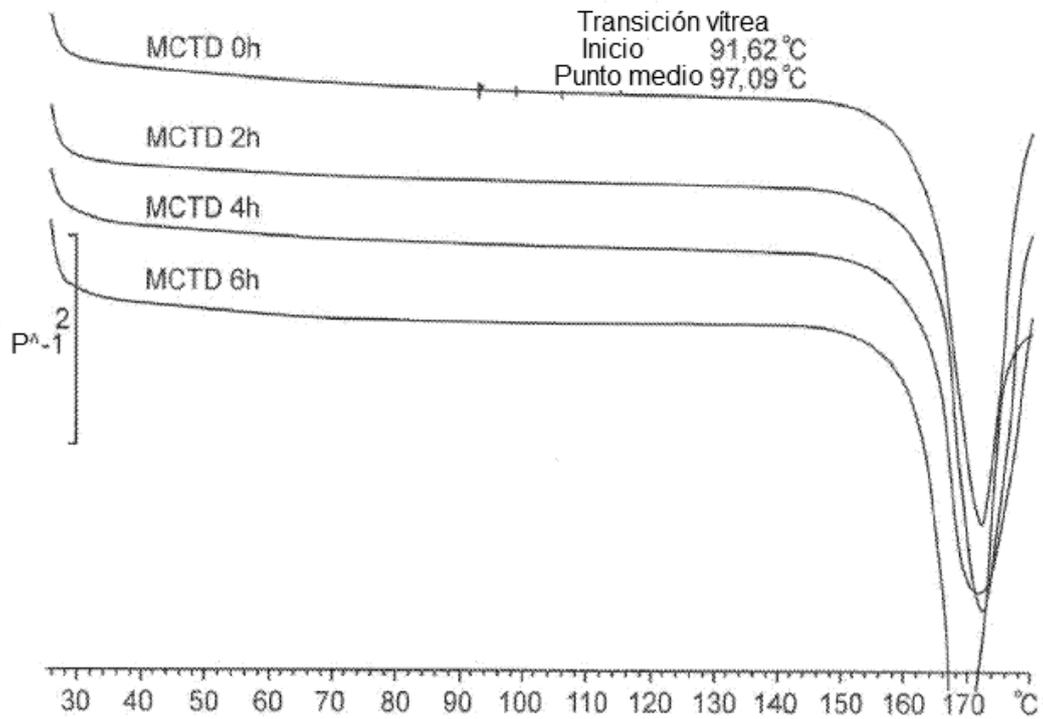


Figura 2A

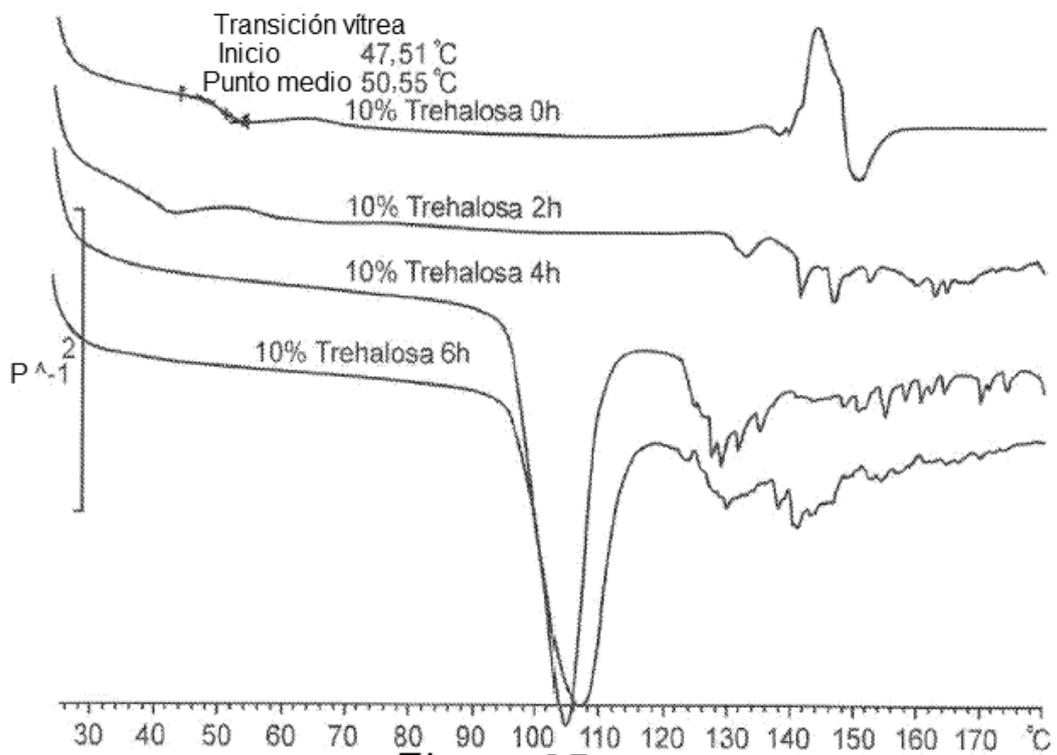


Figura 2B

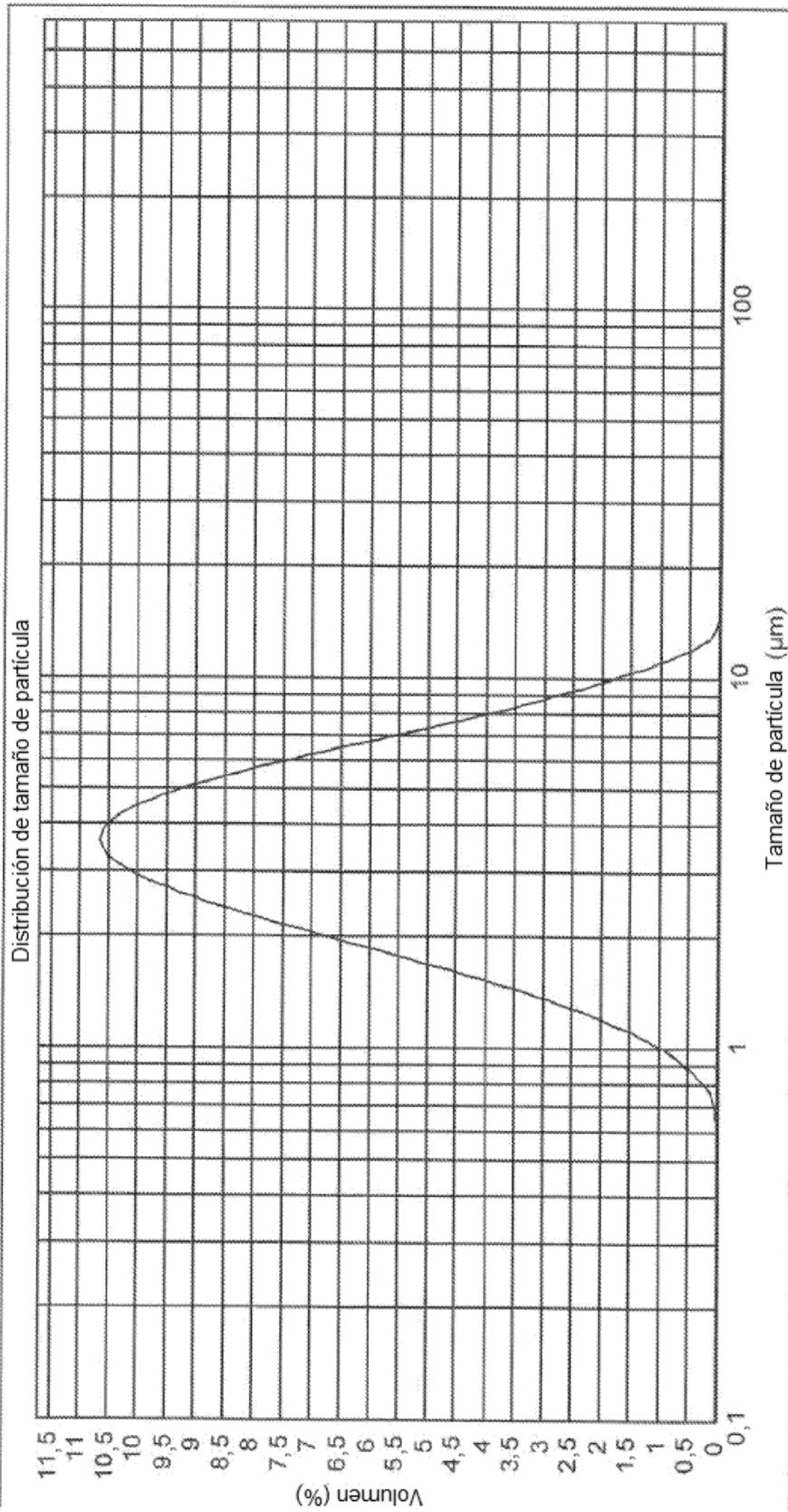


Figura 3

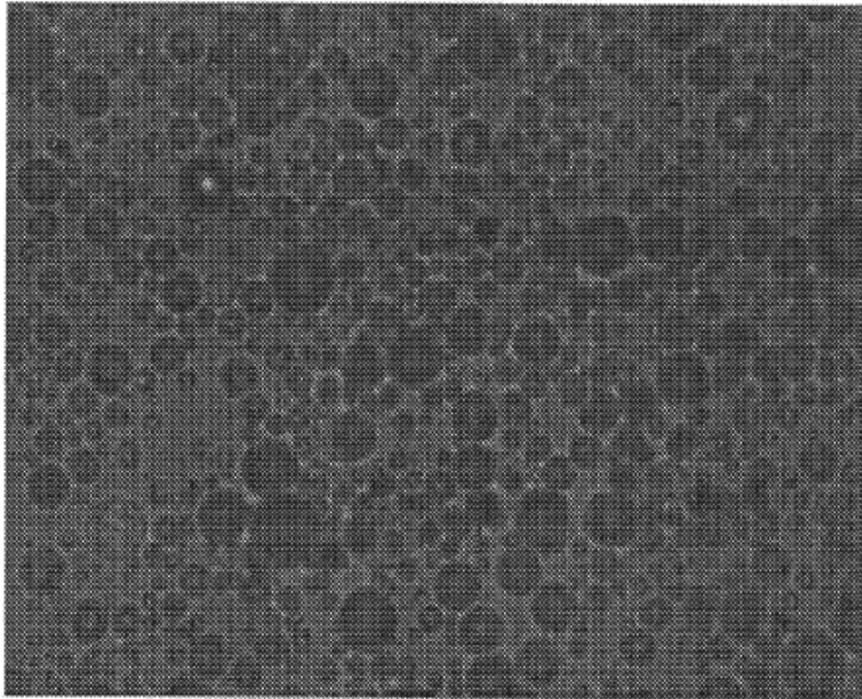


Figura 4A

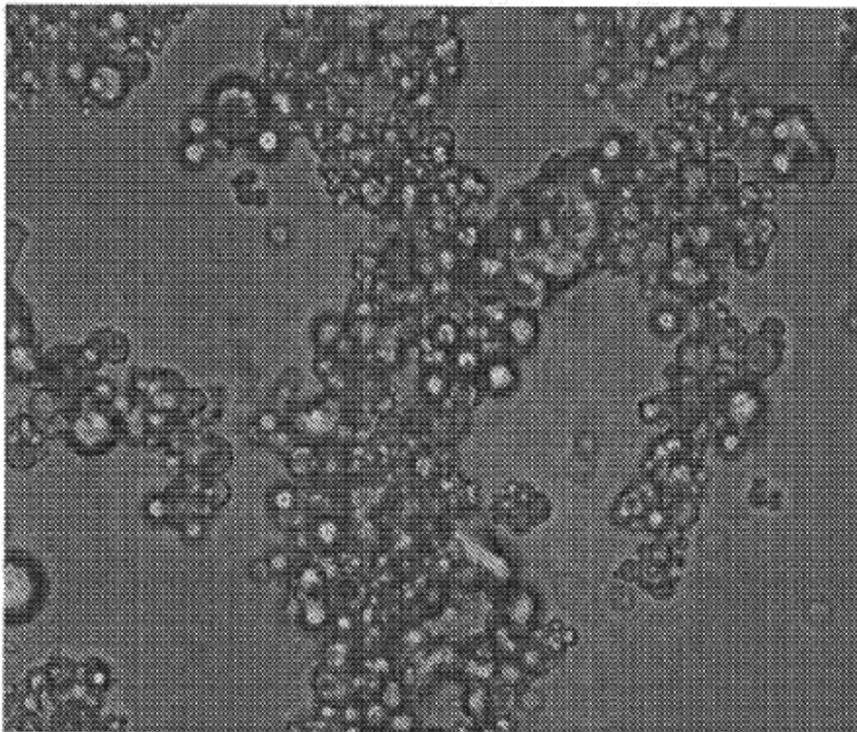
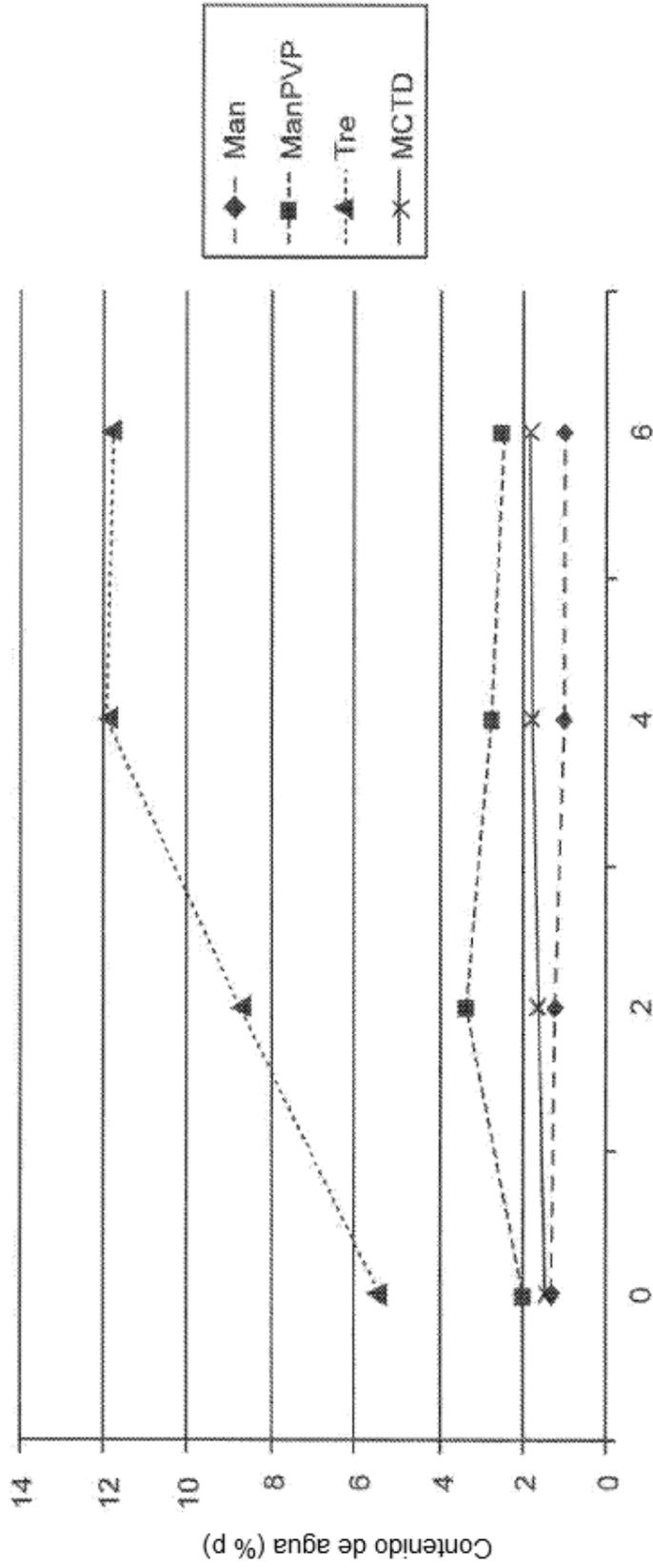


Figura 4B



Tiempo de exposición (h)

Figura 5

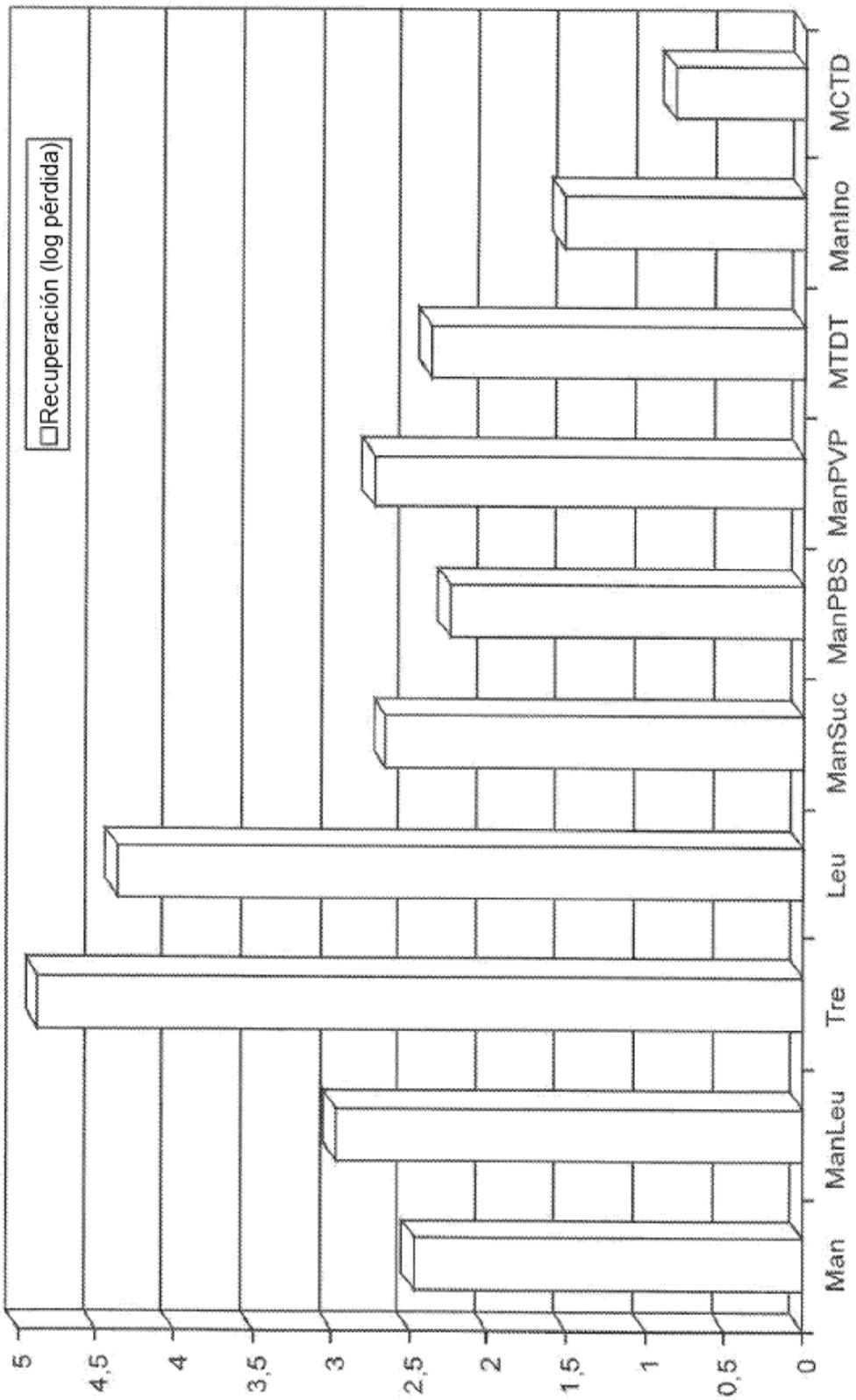


Figura 6

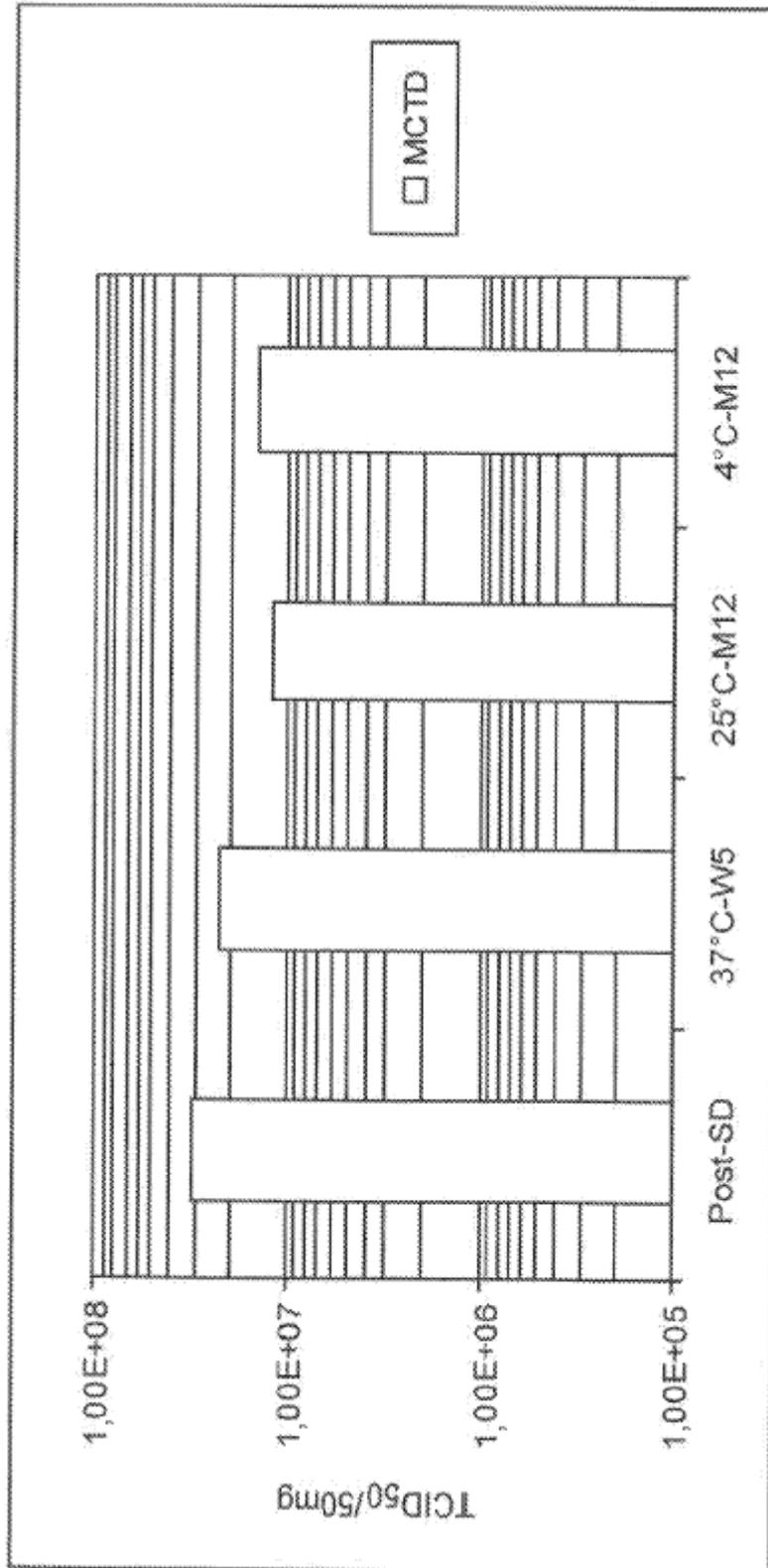


Figura 7