

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 673 823**

51 Int. Cl.:

**A61K 39/12** (2006.01)

**A61K 9/19** (2006.01)

**C12N 15/86** (2006.01)

**C12N 7/00** (2006.01)

**A61K 39/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **02.11.2007 PCT/US2007/083537**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.05.2008 WO08058035**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **02.11.2007 E 07844849 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **21.03.2018 EP 2099485**

54 Título: **Formulaciones de alfavirus y de partículas de replicones de alfavirus y métodos relacionados**

30 Prioridad:

**03.11.2006 US 864366 P**

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

**25.06.2018**

73 Titular/es:

**ALPHAVAX, INC. (100.0%)  
2 TRIANGLE DRIVE  
RESEARCH TRIANGLE PARK, NC 277, US**

72 Inventor/es:

**DEPAZ, ROBERTO A. y  
TALARICO, TODD L.**

74 Agente/Representante:

**ELZABURU, S.L.P**

ES 2 673 823 T3

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

## DESCRIPCIÓN

Formulaciones de alfavirus y de partículas de replicones de alfavirus y métodos relacionados

**Antecedentes de la invención**

5 Un impedimento importante para los esfuerzos de vacunación a nivel mundial es la labilidad térmica de las vacunas. Actualmente la mayoría de las vacunas se almacenan a temperaturas por debajo de la temperatura ambiental a través del mantenimiento de una «cadena de frío» desde el lugar de fabricación hasta el de administración. Si bien se han realizado mejoras en el mantenimiento de la cadena de frío, este sistema es caro, sigue siendo propenso a errores y no siempre suministra vacunas potentes en todas partes del mundo (Zaffran, 1996; Arya, 2001; Rexroad et al., 2002; Brandau et al., 2003). El problema de la estabilidad de las vacunas se hace más difícil debido a la complejidad de ciertos antígenos de la vacuna tales como virus o bacterias atenuados. Estas macromoléculas son conjuntos de diversos componentes (por ejemplo, ácidos nucleicos, proteínas, lípidos) y la degradación en cualquiera de estos componentes puede afectar de forma negativa a la potencia de la vacuna completa. Las vacunas, en general, a menudo se liofilizan, o se criodesecan, para mejorar su estabilidad de almacenamiento, aunque se deben elegir con cuidado los excipientes protectores para realizar estas mejoras y existe la necesidad de identificar excipientes que proporcionarán preparaciones comercialmente útiles y fisiológicamente aceptables de vacunas basadas en alfavirus.

El género Alfavirus incluye una variedad de virus, y todos son miembros de la familia Togaviridae. Los alfavirus incluyen el virus de la encefalitis equina oriental (EEE), virus de la encefalitis equina venezolana (VEE), virus Everglades, virus Mucambo, virus Pixuna, virus de la encefalitis equina occidental (WEE), virus Sindbis, virus Semliki Forest, virus Middleburg, virus Chikungunya, virus O'nyong-nyong, virus Ross River, virus Barmah Forest, virus Getah, virus Sagiyama, virus Bebaru, virus Mayaro, virus Una, virus Aura, virus Whataroa, virus Babanki, virus Kyzylgach, virus Highlands J, virus Fort Morgan, virus Ndumu y virus Buggy Creek. El genoma viral es un ARN mensajero sentido, monocatenario, modificado en el extremo 5' con una caperuza metilada y en el extremo 3' con un tramo poli (A) de longitud variable. Las subunidades estructurales que contienen una sola proteína viral, cápside, se asocian con el genoma de ARN en una nucleocápside icosaédrica. En el virión, la cápside está rodeada por una cubierta lipídica revestida con una serie regular de espículas de proteína transmembranal, cada una de las cuales consiste en un complejo heterodimérico de dos glicoproteínas, E1 y E2. Véase Pedersen et al., J. Virol 14:40 (1974). Los virus Sindbis y Semliki Forest se consideran los alfavirus prototípicos y se han estudiado ampliamente. Véase Schlesinger, The Togaviridae and Flaviviridae, Plenum Publishing Corp., New York (1986). El virus de la VEE se ha estudiado extensamente, véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. No. 5,185,440.

Los estudios de estos virus han conducido al desarrollo de técnicas para vacunación contra las enfermedades por alfavirus y contra otras enfermedades mediante el uso de vectores de alfavirus para la introducción de genes extraños. Véase la Patente de EE.UU. No. 5,185,440 de Davis et al., y la Publicación PCT WO 92/10578. El uso de vectores de alfavirus para dirigir la expresión de genes extraños en eucariotas se ha convertido en un tema de interés creciente. Es bien sabido que las vacunas virales atenuadas vivas se encuentran entre los medios que más éxito han tenido para controlar la enfermedad viral. Sin embargo, para algunos patógenos virales, la inmunización con una cepa de virus vivo puede ser poco práctica o insegura. Una estrategia alternativa es la inserción de secuencias que codifican antígenos inmunizantes de dichos agentes en una cepa viva, replicante de otro virus. Uno de dichos sistemas, que utiliza un vector VEE vivo se describe en las Patentes de EE.UU. Nos. 5,505,947 y 5,643,576 de Johnston et al. Otro sistema de este tipo se describe por Hahn et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2679-2683 (1992), en donde las construcciones del virus Sindbis expresan una forma truncada de la proteína hemaglutinina de influenza. Otro sistema es el sistema replicón de alfavirus, como se ha descrito en la Patente de EE.UU. No. 6,190,666 de Garoff et al., Patentes de EE.UU. Nos. 5,792,462 y 6,156,558 de Johnston et al., Patentes de EE.UU. Nos. 5,814,482, 5,843,723, 5,789,245, 6,015,694, 6,105,686 y 6,376,236 de Dubensky et al; Solicitud Publicada de EE.UU. No. 2002-0015945 A1 (Polo et al.), Solicitud Publicada de EE.UU. No. 2001-0016199 (Johnston et al.), Frolov et al. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:11371-11377 y Pushko et al. (1997) Virology 239:389-401.

Se ha desarrollado una nueva clase de vacunas basadas en alfavirus, un grupo de virus Togaviridae, y por lo tanto, existe la necesidad de identificar formulaciones de vacunas basadas en alfavirus que proporcionarán, desde el punto de vista comercial, una estabilidad relevante durante la congelación, el secado, el almacenamiento y la rehidratación. Las vacunas basadas en alfavirus incluyen cepas de alfavirus atenuados vivos, así como partículas de replicón de alfavirus («ARP», también denominadas VRP para partículas de replicón similares a virus). Algunas veces VRP también se utiliza como un acrónimo para una especie de ARP conocidas como partículas de replicón basadas en VEE. Una ARP es una partícula similar a virus de ~70 nm con propagación defectuosa que se produce en células o cultivos celulares e incorpora un «replicón» que puede expresar genes no-alfavirus dentro de una cubierta del virión que comprende proteínas estructurales de alfavirus y lípidos de membrana. Por lo tanto, las ARP y los alfavirus tienen composiciones de superficie muy similares, o idénticas y se espera que se comporten de manera semejante en los procesos de formulación. En ciertos estudios anteriores, las formulaciones de ARP parecían ser relativamente lábiles en solución, lo que ha presentado un obstáculo en su desarrollo comercial.

60 La Patente de EE.UU. No 6015686 describe composiciones y métodos para utilizar vectores de alfavirus

recombinantes, así como también, composiciones y métodos para fabricar y utilizar sistemas de iniciación de vectores eucariotes en capas. La Publicación de Patente de EE.UU. No. 2002/015945 describe métodos de producción y purificación para virus y vectores derivados de virus, que incluyen aquellos relacionados con alfavirus, así como, métodos de purificación que someten las preparaciones de partículas de replicón de alfavirus a una o más etapas de purificación cromatográfica, tales como el uso de una resina de intercambio iónico, y métodos para caracterizar partículas de replicón de alfavirus y el uso de estos materiales para vacunas y productos terapéuticos basados en genes. Gangemi J D et al describen la agregación e inmunogenicidad del virus de la encefalomielititis equina venezolana después de la criodesecación (Journal Of Biological Standardization, (1978), vol. 6, no. 2, páginas 117 - 120). Fukumoto et al. describen el efecto de diversos aditivos sobre la conservación a largo plazo del virus del mosaico del pepino in vitro (Japanese Journal of Phytopathology, vol. 46, no. 4, 1 de enero de 1980, páginas 448-454). Izutsu et al. describen la protección de la estructura secundaria de la proteína mediante sacáridos de diferentes pesos moleculares durante la criodesecación (Chemical & Pharmaceutical Bulletin, vol. 52, no. 2, 1 de enero de 2004, páginas 199-203). Izutsu et al. describen los efectos del tetraborato de sodio y del ácido bórico sobre la cristalización no isotérmica de manitol en soluciones congeladas y en sólidos criodesecados (International Journal of Pharmaceutics, vol. 273, no. 1-2, 1 de abril de 2004, páginas 85-93).

Usando un ensayo de infectividad in vitro como un indicador de estabilidad, se estableció que la congelación, el secado, el almacenamiento y la rehidratación presentaban vectores de estrés únicos para ARP.

### Compendio de la invención

La presente memoria describe composiciones secadas con estabilidad frente a la criodesecación, la rehidratación y el almacenamiento que comprenden (1) alfavirus o partículas de replicón de alfavirus, (2) una sal, (3) un tensioactivo y (4) un azúcar con enlace a hidrógeno, alcohol de azúcar o poliol. En el contexto de las presentes composiciones, la sal puede ser sulfato de sodio, citrato de sodio, glutamato de sodio, sulfato de magnesio u octasulfato de sacarosa sódica, entre otros. El tensioactivo se puede seleccionar entre los siguientes ejemplos no limitantes: una proteína, un éster de ácido graso de polioxietilensorbitano tal como polisorbato 20 o polisorbato 80, un éter alquílico de polioxietileno tal como Brij™ 35, un éter octilfenol de nonaetilenglicol tal como Tritón X-100 o NP40, éteres de octilfenil heptaetilenglicol, trioleatos de sorbitano que incluyen Span 85, y copolímeros de bloques de polioxietileno y polioxipropileno tales como la serie Pluronic™ de tensioactivos no iónicos. Los ejemplos de proteínas que se pueden usar en las presentes composiciones son albúmina sérica humana o de otro tipo (recombinante o aislada de una fuente que se presenta naturalmente), sulfato de protamina o gelatina. El azúcar, alcohol de azúcar o poliol que sirve como un lioprotector se puede elegir de los siguientes ejemplos no limitantes: sacarosa, rafinosa, trehalosa, glicerol, manitol, sorbitol. La composición puede comprender, de modo opcional, además un agente diluyente; los ejemplos no limitantes incluyen hidroxietil almidón, dextrano, manitol, glicina, Ficoll (polímeros ramificados de sacarosa) y polivinilpirrolidona). Opcionalmente, la composición puede comprender además un plastificante. El plastificante puede ser glicerol, propilenglicol o dimetilsulfóxido, entre otros. La presente invención abarca métodos para preparar una composición seca con estabilidad frente a la rehidratación y al almacenamiento y una composición seca que puede obtenerse mediante el método antes mencionado, ambos como se exponen en las realizaciones adjuntas.

La presente invención abarca métodos para elaborar preparaciones de partículas de alfavirus o de replicón de alfavirus que comprenden las etapas de (a) preparar una solución o dispersión acuosa que comprende virus de encefalitis equina venezolana (VEE) o partículas de replicón de las mismas, una sal, en donde la sal es sulfato de sodio a una fuerza iónica de 50 mM a 400 mM; o en donde la sal es cloruro de sodio a una fuerza iónica de 100 mM a 500 mM, un tensioactivo, en donde el tensioactivo es albúmina de suero humano, y sacarosa; y opcionalmente un plastificante que comprende glicerol; manteniendo la solución o dispersión a un pH de 7 a 9 antes del secado; y tamponando la solución o dispersión con ácido bórico y una sal farmacéuticamente aceptable de tetraborato antes del secado y (b) secar la dispersión acuosa para obtener una composición en donde el VEE, o las partículas del replicón del mismo, se dispersan en una matriz vítrea amorfa que contiene el tensioactivo y sacarosa, y de forma opcional el plastificante y/o agente diluyente. La solución o dispersión del virus, o de las partículas antes del secado es a un pH de 7 a 9 para evitar la descomposición del virus o de la partícula.

De modo conveniente, la solución o dispersión antes del secado comprende partículas de alfavirus o del replicón de alfavirus, de modo conveniente de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^{10}$  o aproximadamente  $10^{11}$ , o de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^9$  o de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^8$  por ml. Una sal está presente a una concentración de aproximadamente 0,1  $\mu$ M (para moléculas muy cargadas tales como polianiones, por ejemplo, sulfato de protamina) a 250 mM, de aproximadamente 1 mM a aproximadamente 250 mM, o de aproximadamente 20 mM a aproximadamente 500 mM, dependiendo de la sal particular. La concentración de sal debe ser lo bastante alta para evitar la agregación de ARP pero no tan alta como para hacer que la formulación sea demasiado hipertónica para la administración o demasiado concentrada para secarse adecuadamente. Para el cloruro de sodio, el intervalo es de 100 mM a 500 mM, y para el sulfato de sodio, el intervalo es de 50 mM a 400 mM. Un tensioactivo está presente en una concentración que es lo bastante alta como para proteger la ARP durante la congelación, pero no lo bastante alta como para alterar la cubierta lipídica. Para la albúmina sérica humana la concentración en la solución o dispersión es de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10% (p/v). Para los tensioactivos (o detergentes), la concentración útil depende del tensioactivo (o detergente) particular, el método de congelación y cómo interactúa con la cubierta lipídica. La solución o dispersión acuosa de ARP (VRP) contiene además un azúcar, alcohol de azúcar o poliol a una concentración de aproximadamente 0,1% a aproximadamente

10% (p/v). La solución o dispersión acuosa puede comprender además un agente diluyente a una concentración de aproximadamente 0,001% a aproximadamente 10% (p/v).

5 En las composiciones secas (como se ejemplifica, criodesecadas) de la presente invención, existe de modo opcional humedad residual presente, de aproximadamente 0,5% a aproximadamente 10% (p/p), de aproximadamente 1 a aproximadamente 8, de 2 a 7, de 2 a 6, o de 3 a 5%. El glicerol se incluyó en las composiciones acuosas y subsecuentemente secadas como un agente plastificante y la concentración de glicerol en la solución antes del secado típicamente es de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5%, o de 0,05 a 2%, o de aproximadamente 0,2 a aproximadamente 1% (p/v) o aproximadamente 0,25%.

10 Para la estabilidad de almacenamiento óptima, el proceso de secado da como resultado la formación de una fase amorfa que contiene las partículas de alfavirus o de replicón de alfavirus, el tensioactivo y el azúcar, alcohol de azúcar o poliol y, de modo opcional, un plastificante. Si está presente un agente diluyente, este puede hallarse en la fase amorfa o ser cristalino. Una formulación útil, antes del secado, comprende partículas del virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) y fosfato sódico 10 mM, sacarosa al 4%, HSA al 0,1%, sulfato sódico 100 mM y glicerol al 0,25%.

### 15 Breve descripción de las figuras

La Fig. 1 es un gel de SDS-PAGE teñido con plata de patrón de peso molecular Mark 12 (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, carril izquierdo), y una carga de  $1,4 \times 10^8$  UI de GFP VRP (carril derecho). Se observan los pesos moleculares para tres de los patrones de proteína (en kDa). Para GFP VRP, se etiquetan las tres bandas de proteína constituyente (Pushko et al., 1997, Ryan et al., 1998).

20 La Fig. 2 ilustra el escaneado de calentamiento DSC (10°C/min) de la formulación S (véase también la Tabla 1) sin tratamiento térmico (escaneado inferior) y con tratamiento térmico (escaneado superior). El tratamiento térmico se produjo a -20°C durante 15 min.

25 La Fig. 3 muestra pérdidas en el título de infectividad para GFP VRP, en comparación con el control a -80°C, después de la congelación-descongelación (barra continua) y después de la criodesecación (barra discontinua). Las barras de error representan 95% de los límites de confianza. Las formulaciones se describen en la Tabla 1.

30 Las Figs. 4A-4B muestran pérdidas en el título de infectividad para GFP VRP después de la rehidratación y el almacenamiento a temperatura ambiente. Control a -80°C: triángulo abierto, línea punteada; B1: rombo abierto, línea punteada; B2: rombo abierto, línea continua; S: cuadrado abierto, línea continua; D: rombo cerrado, línea punteada; A: triángulo cerrado, línea punteada; H: cuadrado cerrado, línea punteada; T: x, línea punteada; SD: rombo cerrado, línea continua; SA: triángulo cerrado, línea continua; SH: cuadrado cerrado, línea continua; ST: x, línea continua; M: cuadrado abierto, línea punteada. La Fig. 4B muestra pérdidas en el título de infectividad cercanas a las 8 horas a partir de la Fig. 4A representada gráficamente como una función de la pérdida del título de infectividad después de la liofilización a partir de la Fig. 3. Las barras de error representan el 95% de los límites de confianza.

35 La Fig. 5 ilustra las pérdidas en el título de infectividad (barra continua) y en las cantidades del genoma (barra discontinua) para GFP VRP no liofilizada durante el almacenamiento en solución a 2-8°C durante un mes. Las barras de error para las pérdidas en el título de infectividad representan los límites de confianza del 95%. Las diferencias mayores de dos veces (-0.3 log) se consideran significativas para las cantidades del genoma.

40 La Fig. 6 muestra pérdidas en el título de infectividad para GFP VRP liofilizada, en comparación con el control a -80°C, durante el almacenamiento a 37°C. B1: rombo abierto, línea punteada; B2: rombo abierto, línea continua; S: cuadrado abierto, línea continua; D: rombo cerrado, línea punteada; A: triángulo cerrado, línea punteada; H: cuadrado cerrado, línea punteada; T: x, línea punteada; SD: rombo cerrado, línea continua; SA: triángulo cerrado, línea continua; SH: cuadrado cerrado, línea continua; ST: x, línea continua; M: cuadrado abierto, línea punteada. Las barras de error representan los límites de confianza del 95%.

45 La Fig. 7 ilustra la relación entre el tamaño de la ARP, la sal y la concentración de sal. D (nm) es un diámetro «eficaz» medido mediante dispersión dinámica de la luz después de, aproximadamente 8 horas en solución. El eje x es la fuerza iónica en mM. Rombos cerrados, cloruro de sodio; cuadrados cerrados, sulfato de sodio; triángulos cerrados, citrato de sodio; rombos abiertos, octasulfato de sacarosa sódica; cuadrados abiertos, sulfato de magnesio.

50 La Fig. 8 muestra esquemáticamente la pérdida de infectividad para las preparaciones de ARP a dos fuerzas iónicas diferentes después de la filtración. Las preparaciones de ARP a dos fuerzas iónicas diferentes se filtraron después de unas 3 horas en solución; se observó una pérdida en el título de infectividad para la preparación a baja fuerza iónica.

55 La Fig. 9 muestra la pérdida de equivalentes del genoma para preparaciones de ARP a dos fuerzas iónicas diferentes después de la filtración. Las preparaciones de ARP a dos fuerzas iónicas diferentes se filtraron después de aproximadamente 3 horas en solución; se observó una pérdida de equivalentes del genoma (medida por qPCR) para la preparación a baja fuerza iónica.

- Las Figs. 10A-10B muestran que los polipéptidos y proteínas altamente cargados estabilizan las ARP contra la agregación. La Fig. 10A muestra los resultados obtenidos con sulfato de protamina, una proteína altamente básica de ~5-6 kDa. La Fig. 10B muestra los resultados obtenidos con poli-L-lisina. Los datos representan títulos de infectividad después de la filtración de soluciones a diferentes concentraciones del polipéptido. La línea punteada en cada gráfica es la línea de referencia de recuperación al 100%.
- La Fig. 11 muestra el efecto de la humedad sobre la estabilidad de ARP en preparaciones liofilizadas. El eje y es la pérdida en el título después de 14 días a 37°C en comparación con el título antes de la liofilización. La «C» para los dos contenidos más altos de humedad se refiere al hecho de que estas formulaciones colapsaron después de la liofilización y el almacenamiento.
- La Fig. 12 muestra la pérdida del título de infectividad cuando el contenido de humedad de la formulación varió al extraer los viales del liofilizador en diferentes momentos durante el secado secundario y el almacenamiento a 37°C. El eje y es la pérdida en el título después de 14 días a 37°C en comparación con el título antes de la liofilización.
- La Fig. 13 muestra el efecto de incluir glicerol en las formulaciones de GFP VRP liofilizadas. Todas las formulaciones contenían fosfato/sacarosa/HSA/metionina con concentraciones variables de glicerol (% p/v). El almacenamiento fue a 37°C por el número indicado de días. Rombos cerrados, 0 días; cuadrados cerrados, 3 días; triángulos cerrados, 7 días; rombos abiertos, 10 días; y asteriscos, 14 días.
- La Fig. 14 muestra el efecto de incluir glicerol en las formulaciones de GFP VRP liofilizadas. Todas las formulaciones contenían fosfato/sacarosa/HSA/metionina/octasulfato de sacarosa sódica con concentraciones variables de glicerol (% p/v). El almacenamiento fue a 37°C por el número indicado de días. Rombos cerrados, 0 días; cuadrados cerrados, 3 días; triángulos cerrados, 7 días; rombos abiertos, 10 días; y asteriscos, 14 días.
- La Fig. 15 muestra el título de infectividad de una formulación de BoNT/B Hc VRP liofilizada durante el almacenamiento a -20°C (rombos) y 2-8°C (cuadrados).
- La Fig. 16 muestra el título de infectividad de (A) formulación de GFP VRP liofilizada o (B-C) hemoaglutinina de influenza liofilizada (Flu HA (A/WY H3) VRP durante el almacenamiento a -20°C (rombos) y 2-8°C (cuadrados).
- La Fig. 17 muestra el efecto de incluir glicerol y polipropilenglicol en formulaciones de GFP VRP liofilizadas. Las formulaciones contenían fosfato/sacarosa/HSA/metionina/sulfato de sodio. El almacenamiento es a temperatura ambiente por el número indicado de meses. Rombos cerrados, sin glicerol y sin polipropilenglicol, cuadrados cerrados, 0,2% de glicerol y sin polipropilenglicol, triángulos cerrados, 0,2% de glicerol y 0,01% de polipropilenglicol 725; y rombos abiertos, 0,2% de glicerol y 0,2% de polipropilenglicol 3500.
- La Figura 18 muestra el efecto de incluir tetraborato de sodio en formulaciones de GFP VRP liofilizadas. Ambas formulaciones contenían fosfato/sacarosa/HSA/sulfato de sodio/glicerol con o sin tetraborato de sodio. El almacenamiento fue a temperatura ambiente durante el número indicado de meses. Rombos cerrados, sin tetraborato; cuadrados cerrados, con tetraborato de sodio 35 mM.

### Descripción detallada de la invención

- Se proporcionan la siguiente discusión y definiciones para mejorar la claridad de la presente descripción para un experto en la técnica relevante.

En el contexto de la presente solicitud, nm significa nanómetro; mL (o ml) significa mililitro, VEE significa virus de la encefalitis equina venezolana, EMC significa virus de la encefalomiocarditis, BHK significa células de riñón de cría de hámster, HA significa hemaglutinina, GFP significa proteína verde fluorescente N significa nucleocápside, FACS significa clasificador celular activado por fluorescencia, IRES significa sitio interno de entrada al ribosoma, pfu significa unidades formadoras de placa, IU significa unidades infecciosas y FBS significa Suero Bovino Fetal. La expresión «número de aminoácido E2 (por ejemplo, Lys, Thr, etc.)» indica un aminoácido designado en el resto designado de la proteína E2, y también se emplea para referirse a los aminoácidos en restos específicos en las proteínas E3 o E1. En el contexto de la presente invención, ARP y VRP se usan indistintamente, y significa partículas de alfavirus o de replicón alfavirus o partículas de virus VEE o de replicón del virus.

Tal como se usa en este documento, el término «alfavirus» tiene su significado convencional en la técnica, e incluye varias especies tales como Virus VEE, un VEE TC-83, Virus Semliki Forest (SFV), Sindbis, Virus Ross River, Virus de la encefalitis equina occidental, virus de la encefalitis equina oriental, virus Chikungunya, S.A. AR86, Virus Everglades, Virus Mucambo, Virus Barmah Forest, Virus Middleburg, Virus Pixuna, Virus O'nyong-nyong, Virus Getah, Virus Sagiyama, Virus Bebaru, Virus Mayaro, Virus Una, Virus Aura, Virus Whataroa, Virus Banbanki, Virus Kyzylagach, Virus Highlands J, Virus Fort Morgan, Virus Ndumu y Virus Buggy Creek. Los alfavirus utilizados en las construcciones y métodos descritos en el presente documento son VEE, S.A., AR86, Sindbis (por ejemplo, TR339, véase la Patente de EE.UU. No. 6,008,035) y Virus Semliki Forest (SFV).

Los términos «replicón de ARN de alfavirus», «ARN de replicón de alfavirus», «replicón del vector de ARN de alfavirus» y «ARN del replicón del vector» se emplean de modo indistinto para referirse a una molécula de ARN que

expresa genes de proteínas no estructurales tales que puede dirigir su propia replicación (amplificación) y comprende, como mínimo, las secuencias 5' y 3' de reconocimiento de la replicación de alfavirus (que pueden ser las secuencias mínimas, como se definió con anterioridad, pero alternativamente pueden ser regiones completas del alfavirus), secuencias codificantes para proteínas no estructurales de alfavirus y un tramo de poliadenilación. Puede contener además uno o más elementos (tales como un promotor o un IRES) para dirigir la expresión, es decir, la transcripción y traducción, de una secuencia de ARN heterólogo. También puede diseñarse para expresar proteínas estructurales de alfavirus. Johnston et al., Polo et al. (Solicitud Publicada de EE.UU. No. 2002-0015945), Smith et al. (Publicación de Patente Internacional WO 2004/085660) y Smith et al. (Patente de EE.UU. No. 7,045,335) describen numerosas construcciones para dichos replicones de ARN de alfavirus. Las realizaciones específicas de los replicones de ARN de alfavirus pueden contener una o más mutaciones atenuantes, siendo una mutación atenuante una delección de nucleótido, adición o sustitución de uno o más nucleótido(s) o una mutación que comprende una reorganización o construcción quimérica que da como resultado una pérdida de virulencia en un virus vivo que contiene la mutación en comparación con el alfavirus apropiado de tipo silvestre. Los ejemplos de una sustitución atenuante de nucleótido (que da lugar a un cambio de aminoácido en el replicón) incluyen una mutación en la posición 538 del aminoácido nsP1, la posición 96 del aminoácido nsP2 o la posición 372 del aminoácido nsP2 en el alfavirus S.A.AR86 y un ejemplo de una mutación atenuante en la región no codificante del ácido nucleico del replicón es la sustitución de A o C en el nucleótido 3 en VEE.

Los términos «proteína/proteína(s) estructural(es) del alfavirus» se refieren a una o una combinación de las proteínas estructurales codificadas por alfavirus. Estas se producen por el virus como una poliproteína y se representan, por regla general, en la literatura como C-E3-E2-6k-E1. E3 y 6k sirven como señales de translocación/transporte de membrana para las dos glicoproteínas, E2 y E1. Así, el uso del término E1 en este documento se puede referir a E1, E3-E1, 6k-E1 o E3-6k-E1, y el uso del término E2 en este documento se puede referir a E2, E3-E2, 6k-E2 o E3-6k-E2. Es posible introducir mutaciones atenuantes en una cualquiera o más de las proteínas estructurales de alfavirus.

El término «auxiliar(es)» o «construcción(es) auxiliar(es)» se refiere a una molécula de ácido nucleico que es capaz de expresar una o más proteínas estructurales de alfavirus. Johnston et al. (Patentes de EE.UU. Nos. 5,792,462 y 6,156,558), Polo et al. (Solicitud Publicada de EE.UU. No. 2002-0015945), Smith et al. (Publicación de Patente Internacional WO 2004/085660) y Smith et al. (Patente de EE.UU. No. 7,045,335) describen numerosas construcciones auxiliares útiles para expresar proteínas estructurales de alfavirus en la producción de ARPs.

Los términos «célula auxiliar» y «célula empaquetadora» se usan indistintamente en este documento y se refieren a la célula en la que se producen partículas de replicón de alfavirus. La célula auxiliar comprende un conjunto de agentes auxiliares que codifican una o más proteínas estructurales de alfavirus. Como se describe en este documento, los agentes auxiliares pueden ser ARN o ADN. La célula puede ser cualquiera capaz de producir alfavirus, es decir, células capaces de producir partículas de alfavirus después de la introducción de un transcrito de ARN viral. Las células capaces de producir alfavirus incluyen, pero no se limitan a, células Vero, células de riñón de cría de hámster (BHK), 293T, fibroblastos de embrión de pollo (CEF) y células de ovario de hámster chino (CHO). La célula auxiliar o empaquetadora puede incluir, de modo adicional, una ARN polimerasa dependiente de ARN heterólogo y/o una proteasa específica de secuencia. Los ácidos nucleicos que codifican proteínas estructurales de alfavirus pueden estar presentes en la célula auxiliar, de manera transitoria o mediante la integración estable en el genoma de la célula auxiliar. El ácido nucleico que codifica las proteínas estructurales del alfavirus que se utilizan para producir partículas de alfavirus es posible que esté bajo el control de promotores constitutivos y/o inducibles. En una realización, las secuencias codificantes de proteína estructural del virus alfa se pueden proporcionar en un ADN auxiliar sencillo (véase Smith et al. Patente de EE.UU. No. 7,045,335) o como dos construcciones auxiliares que comprenden un elemento IRES en el que la traducción de estas secuencias codificantes se puede controlar por la actividad de un elemento IRES. En dichas realizaciones, el elemento IRES puede hallarse activo en el tipo específico de célula auxiliar y no en otros tipos de células o estarlo mínimamente. En realizaciones particulares, las células auxiliares comprenden secuencias de ácido nucleico que codifican las proteínas estructurales de alfavirus en una combinación y/o cantidad suficiente para producir una partícula de alfavirus cuando se introduce un ácido nucleico recombinante de replicón dentro de la célula bajo condiciones en que se producen proteínas estructurales de alfavirus y el ácido nucleico recombinante del replicón se empaqueta dentro de las partículas de replicón de alfavirus.

Los términos «partículas de replicón de alfavirus», «partículas de replicón de virus» o «partículas de alfavirus recombinante», utilizados de manera indistinta en este documento, significan un complejo estructural semejante a virión que incorpora un replicón de ARN del alfavirus que expresa una o más secuencias de ARN heterólogo. Típicamente, el complejo estructural semejante a virión incluye una o más proteínas estructurales de alfavirus embebidas en una envoltura lipídica que encierra una nucleocápside que, a su vez, encierra el ARN. La envoltura lipídica se deriva típicamente de la membrana plasmática de la célula en la que se producen las partículas. Preferiblemente, el replicón de ARN de alfavirus está rodeado por una estructura de nucleocápside compuesta de la proteína de la cápside del alfavirus, y las glicoproteínas del alfavirus están embebidas en la envoltura lipídica derivada de la célula. Las proteínas estructurales y el replicón de ARN pueden derivarse del mismo o de diferentes alfavirus. En una realización específica, el replicón de ARN y las proteínas estructurales son del VEE, por ejemplo, véase Smith et al., Publicación de Patente de EE.UU. 2005-0266550. En otra realización, el replicón de ARN se deriva de VEE y las proteínas estructurales se derivan del virus Sindbis (véase, por ejemplo, Dubensky et al.,

Patente de EE.UU. No. 6,376,236). Las partículas del replicón de alfavirus son infecciosas pero defectuosas para la propagación, es decir, el replicón de ARN no puede propagarse más allá de la célula huésped en la que las partículas infectan en un principio, en la ausencia del (los) ácido(s) nucleico(s) auxiliar(es) que codifica(n) las proteínas estructurales del alfavirus.

5 Las composiciones inmunogénicas (o vacunas) pueden abarcar una ARP que no expresa un ácido nucleico heterólogo; es decir, es una ARP «vacía». Estas ARP vacías se describen en Thompson et al. (2006) «Mucosal and Systemic adjuvant activity of alphavirus replicon particles» Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:3722-3737. Dichas ARPs vacías se pueden formular mediante los métodos descritos a continuación, y pueden ser útiles como adyuvantes de vacunas para otras preparaciones de ARP o preparaciones de antígeno no ARP.

10 En una realización específica, la partícula de alfavirus atenuado vivo expresa una secuencia heteróloga de ácido nucleico de interés, como se describe en la Patente de EE.UU. No. 5,643,576 (Johnston et al.). Los métodos para producir partículas de alfavirus atenuados vivos se conocen en la técnica, por ejemplo, Patente de EE.UU. No. 5,185,440 (Davis et al.).

15 En determinadas realizaciones, la ARP codifica «un ácido nucleico heterólogo» o una secuencia de ácido nucleico heterólogo que puede significar un ácido nucleico heterólogo o múltiples ácidos nucleicos heterólogos. El ácido nucleico heterólogo puede codificar una proteína o péptido, que puede ser, pero no se limita a, un antígeno, un inmunógeno o polipéptido o péptido inmunogénico, una proteína de fusión, un péptido de fusión, un antígeno cancerígeno, una proteína inmunoestimulante, etc. Los ejemplos de proteínas y/o péptidos codificados por el ácido nucleico heterólogo incluyen, pero no se limitan a, polipéptidos y péptidos inmunogénicos adecuados para proteger a un sujeto contra una enfermedad o para reducir la incidencia y/o gravedad de una enfermedad, que incluyen, pero no se limitan a enfermedades microbianas, bacterianas, protozoarias, fúngicas, parasitarias y virales y trastornos neoplásicos (por ejemplo, cáncer).

20 Una «proteína inmunogénica», «polipéptido inmunogénico», «péptido inmunogénico» o «inmunógeno» como se usa en el presente documento incluye cualquier péptido, proteína o polipéptido que provoca una respuesta inmune en un sujeto y en determinadas realizaciones, el polipéptido inmunogénico es adecuado para proporcionar cierto grado de protección a un sujeto contra una enfermedad. Estos términos se pueden utilizar indistintamente con el término «antígeno». El inmunógeno puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en uno o más «epítomos». Un «epítopo» es un conjunto de restos de aminoácidos que participa en el reconocimiento por una inmunoglobulina particular. En el contexto de las células T, un epítopo se define como el conjunto de restos de aminoácidos necesarios para el reconocimiento por las proteínas receptoras de la célula T y/o receptores de MHC. En un entorno de sistema inmune, in vivo o in vitro, un epítopo se refiere a las características colectivas de una molécula, tales como estructura peptídica primaria, secundaria y/o terciaria, y/o carga, que juntas forman un sitio reconocido por una inmunoglobulina, receptor de célula T y/o molécula HLA. En el caso de un epítopo de célula B (anticuerpo), típicamente es de un mínimo de 3-4 aminoácidos, preferiblemente de al menos 5, con un intervalo de hasta aproximadamente 50 aminoácidos. Preferiblemente, los epítomos inductores de la respuesta humoral son entre 5 y 30 aminoácidos, lo usual es que sean entre 12 y 25 aminoácidos, y más comúnmente entre 15 y 20 aminoácidos. En el caso de un epítopo de célula T, un epítopo incluye al menos aproximadamente 7-9 aminoácidos, y para un epítopo de célula T auxiliar, al menos aproximadamente 12-20 aminoácidos. Típicamente, dicho epítopo de célula T incluirá entre aproximadamente 7 y 15 aminoácidos, por ejemplo, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 aminoácidos.

40 En determinadas realizaciones, por ejemplo, la proteína o péptido codificado por el ácido nucleico heterólogo puede ser, o puede derivarse de, un inmunógeno de ortomixovirus (por ejemplo, una proteína o péptido del virus de la gripe tal como la proteína de superficie hemaglutinina (HA) del virus de la gripe o la nucleoproteína del virus de la gripe, o una proteína o péptido del virus de la influenza equina, o un inmunógeno del virus de la parainfluenza, o un inmunógeno del metapneumovirus, o un inmunógeno del virus respiratorio sincitial, o un inmunógeno del rinovirus, un inmunógeno del lentivirus (por ejemplo, una proteína o péptido del virus de la anemia infecciosa equina), una proteína o péptido del Virus de Inmunodeficiencia de Simio (SIV) o una proteína o péptido del Virus de Inmunodeficiencia Humana (HIV), como la proteína GP160 de la envoltura del HIV o SIV, las proteínas de la matriz/cápside del HIV o SIV y los productos génicos gag, pol y env de HIV o SIV). La proteína o péptido también puede ser un inmunógeno de arenavirus (por ejemplo, proteína o péptido del virus de la fiebre de Lassa, como la proteína de la nucleocápside del virus de la fiebre de Lassa y la glicoproteína de la cubierta de la fiebre de Lassa), un inmunógeno de picornavirus (por ejemplo, una proteína o péptido del virus de la fiebre aftosa), un inmunógeno de poxvirus (por ejemplo, una proteína o péptido de vaccinia, tal como la proteína L1 o L8 de vaccinia), un inmunógeno de orbivirus (por ejemplo, una proteína o péptido del virus de la enfermedad equina africana), un inmunógeno de flavivirus (por ejemplo, una proteína o péptido del virus de la fiebre amarilla, una proteína o péptido del virus del Nilo Occidental o un péptido o proteína del virus de la encefalitis japonesa), un inmunógeno de filovirus (por ejemplo, una proteína o péptido del virus de Ébola o una proteína o péptido del virus de Marburg, tales como proteínas NP y GP), un inmunógeno de bunyavirus (por ejemplo, proteínas o péptidos RVFV, CCHF y SFS) o un inmunógeno de coronavirus (por ejemplo, una proteína o péptido de coronavirus humano infeccioso, como la glicoproteína de la cubierta de coronavirus humano o una proteína o péptido del virus de la gastroenteritis transmisible por porcinos, o una proteína o péptido del virus de la bronquitis infecciosa aviar). La proteína o polipéptido codificado por el ácido nucleico heterólogo además puede ser un antígeno de polio, antígeno de herpes (por ejemplo, antígenos de CMV, EBV, HSV) antígeno de parotiditis, antígeno de sarampión, antígeno de rubéola, antígeno de varicela, toxina

botulínica, toxina de difteria u otro antígeno de difteria, antígeno de pertussis, antígeno de hepatitis (por ejemplo, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D o hepatitis E), o cualquier otro antígeno de vacuna conocido en la técnica.

5 Las ARP también pueden expresar un ácido nucleico que codifica un polipéptido inmunogénico en un sujeto (por ejemplo, para vacunación o para inmunoterapia, por ejemplo, para tratar un sujeto con cáncer o tumores). La proteína o péptido inmunogénico puede ser cualquier antígeno de tumor o célula cancerosa. Preferiblemente, el antígeno de tumor o de cáncer se expresa sobre la superficie de la célula cancerosa. Los antígenos de cáncer ejemplares para cánceres de mama específicos son los antígenos HER2 y BRCA1. Otros antígenos ilustrativos de células cancerosas y tumorales se describen en S.A. Rosenberg, (1999) Immunity 10:281 e incluyen, pero no se limitan a, los antígenos MART-1/MelanA, gp100, tirosinasa, TRP-1, TRP-2, MAGE-1, MAGE-3, GAGE-1/2, BAGE, RAGE, NY-ESO-1, CDK-4,  $\beta$ -catenina, MUM-1, Caspasa-8, KIAA0205, HPVE&, SART-1, PRAME, p15 y p53, antígeno tumoral del tumor de Wilms, tirosinasa, antígeno carcinoembrionario (CEA), antígeno prostático específico (PSA), antígeno de membrana específico de la próstata (PSMA), antígeno de célula madre prostática (PSCA), aspartil (asparaginil)  $\beta$ -hidroxilasa humana (HAAH), y EphA2 (una tirosina cinasa de célula epitelial, véase la Publicación de Patente Internacional No. WO 01/12172).

10 Las composiciones que contienen ARP proporcionadas en este documento también se pueden emplear para producir una respuesta inmune contra agentes infecciosos crónicos o latentes, que típicamente persisten porque no provocan una respuesta inmune fuerte en el sujeto. Los agentes infecciosos latentes o crónicos ilustrativos incluyen, pero no se limitan a, hepatitis B, hepatitis C, virus de Epstein-Barr, virus del herpes, virus de inmunodeficiencia humana y virus del papiloma humano.

El polipéptido o péptido inmunogénico expresado por las ARPs también puede ser un antígeno de célula cancerosa o tumoral «universal» o «artificial» como se describe en la Publicación de Patente Internacional WO 99/51263.

25 Se emplea un promotor para dirigir la transcripción del ARN de ARN mensajero para producir una proteína codificada por el ARN de replicón de alfavirus, por ejemplo, una proteína inmunogénica, una proteína terapéutica o una proteína con actividad inmunomoduladora. El promotor está unido operativamente a la secuencia codificante de esta proteína.

30 Una vez que un transcrito de ARN (ARNm) que codifica los vectores de auxiliar o de replicón de ARN está presente en la célula auxiliar (ya sea mediante métodos in vitro o in vivo, como ya se describió), éste finalmente se traduce para producir los polipéptidos o proteínas codificados. En determinadas realizaciones, el replicón del vector de ARN se transcribe in vitro a partir de un plásmido de ADN y, luego, se introduce en la célula auxiliar mediante electroporación. En otras realizaciones, el replicón de vector de ARN se transcribe in vivo a partir de un plásmido de vector de ADN que se transfecta a la célula auxiliar (por ejemplo, véase la Patente de EE.UU. No. 5,814,482) o se envía a la célula auxiliar a través de un virus o partícula similar a virus.

35 El replicón de vector de ARN de alfavirus usado en los métodos y composiciones proporcionadas en el presente documento también cabe modificarse por ingeniería genética para expresar IL-12, generando de este modo una ARP que se puede emplear como un adyuvante para ARPs, el replicón en esta última ARP expresa una o más secuencias heterólogas de codificación, como se describió en el presente documento. Se pueden expresar otras citoquinas y factores inmunomoduladores en las ARPs y formularse de acuerdo con los métodos y formulaciones descritas en este documento.

40 Como se utiliza en este documento, la expresión dirigida por una secuencia particular es la transcripción de una secuencia asociada corriente abajo. Si es apropiada y se desea para la secuencia asociada, entonces el término expresión también abarca la traducción (síntesis de proteína) del ARN transcrito o introducido. Alternativamente, se pueden usar diferentes secuencias para dirigir la transcripción y traducción.

45 Las células permisivas de alfavirus empleadas en los presentes métodos son células que, después de la transfección con un transcrito de ARN viral completo, son capaces de producir partículas virales. Los alfavirus tienen un amplio espectro de huéspedes. Los ejemplos de células empaquetadoras adecuadas incluyen, pero no se limitan a, células Vero, células de riñón de cría de hámster (BHK), células de fibroblasto de embrión de pollo, DF-1, 293, 293T, células de ovario de hámster chino (CHO) y células de insectos.

50 Tal y como se describe en este documento, las proteínas estructurales del alfavirus se distribuyen entre una o más moléculas de ácido nucleico auxiliar (por ejemplo, un primer ARN [o ADN] auxiliar y un segundo ARN [o ADN] auxiliar). Además, una o más proteínas estructurales se pueden localizar sobre la misma molécula que el ácido nucleico del replicón, con la condición de que al menos una proteína estructural se elimine del ARN replicón de tal manera que el replicón y la partícula de alfavirus resultante tengan replicación defectuosa. Como se utiliza en el presente documento, los términos «suprimido» o «delección» significan ya sea la delección total del segmento especificado o la delección de una porción suficiente del segmento especificado para dejar el segmento no operativo o no funcional, de acuerdo con el uso estándar. Véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. No. 4,650,764 de Temin et al. El término «replicación defectuosa» como se usa en este documento es sinónimo de «propagación defectuosa» y significa que las partículas producidas en una célula huésped dada no pueden producir partículas de progenie en la

célula huésped, debido a la ausencia de la función auxiliar, es decir, las proteínas estructurales del alfavirus requeridas para empaquetar el ácido nucleico del replicón. Sin embargo, el ácido nucleico del replicón es capaz de replicarse y expresarse dentro de la célula huésped en la que se ha introducido.

5 Los métodos para la producción económica y eficiente de partículas de alto rendimiento se describen en la Patente de EE.UU. No. 7,078,218, expedida el 18 de julio de 2006, puesto que son cepas atenuadas específicas y virus  
 útiles para la expresión de ácidos nucleicos heterólogos que codifican inmunógenos o una secuencia codificante de  
 10 IL-12 expresable. Véase también US 2005-0266550, publicado el 01/12/05. Las células auxiliares para partículas empaquetadoras se describen, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. No. 6,242,259). Una alternativa a los múltiples ARNs auxiliares es el uso de una única molécula de ADN, que codifica todos los polipéptidos necesarios para  
 15 empaquetar el ARN del replicón viral en partículas de replicón de alfavirus infeccioso. El ADN auxiliar único se puede introducir en la célula empaquetadora por cualquier medio conocido en la técnica, incluyendo, pero no limitado a electroporación, transfección mediada por lípidos (lipofección), vectorizado viral (por ejemplo, adenovirus o SV-40) o transfección mediada por fosfato de calcio. Preferiblemente, el ADN se introduce por métodos basados en electroporación. Típicamente el ADN se electropora dentro de células con una disminución en el voltaje y un  
 20 aumento en la capacitancia, en comparación con lo requerido para la absorción de ARN. En todas las electroporaciones, se debe establecer el valor para el voltaje y la capacitancia para evitar la destrucción de la capacidad de las células empaquetadoras (huéspedes) para producir partículas de alfavirus infecciosas. Alternativamente, se puede incorporar la función auxiliar, en este formato y bajo un promotor inducible, en el genoma de la célula empaquetadora antes de la introducción/expresión del replicón del vector de ARN, y luego se induce con el estímulo apropiado justo antes de, concomitante con, o después de la introducción del replicón del vector de ARN.

De manera ventajosa, uno o más de los ácidos nucleicos que codifican las proteínas estructurales de alfavirus, es decir, la cápside, la glicoproteína E1 y la glicoproteína E2, o la construcción del replicón, contienen una o más mutaciones atenuantes. Las frases «mutación atenuante» y «aminoácido atenuante», como se utilizan en el presente documento, significan una mutación de nucleótido (que puede estar o no en una región del genoma viral  
 25 que codifica polipéptidos) o un aminoácido codificado por una mutación de nucleótido, que en el contexto de un virus vivo, da como resultado una menor probabilidad de que el alfavirus cause enfermedad en su huésped (es decir, una pérdida de virulencia), de acuerdo con la terminología estándar en la técnica, véase, por ejemplo, B. Davis, et al., Microbiology 156-158, (4ª ed., 1990), en caso de que la mutación sea una mutación de sustitución, o una mutación de delección o adición dentro del marco. La frase «mutación atenuante» excluye mutaciones que podrían ser letales para el virus, a menos que dicha mutación se use en combinación con una mutación «restauradora» que hace que el virus sea viable, aunque atenuado. Los métodos para identificar mutaciones atenuantes adecuadas en el genoma del alfavirus se conocen en la técnica. Olmsted et al. (1984; Science 225:424) describe un método para identificar mutaciones atenuantes en el virus Sindbis seleccionando para el crecimiento rápido en cultivo celular. Johnston y Smith (1988; Virology 162:437) describen la identificación de mutaciones atenuantes en VEE aplicando presión  
 30 selectiva directa para la penetración acelerada de células BHK. Las mutaciones atenuantes en los alfavirus se han descrito en la técnica, por ejemplo, White et al. 2001 J. Virology 75:3706; Kinney et al. 1989 Virology 70:19; Heise et al. 2000 J. Virology 74:4207; Bernard et al. 2000 Virology 276:93; Smith et al. 2001 J. Virology 75:11196; Heidner y Johnston 1994 J. Virology 68:8064; Klimstra et al. 1999 J. Virology 73:10387; Glasgow et al. 1991 Virology 185:741; Polo y Johnston 1990 J. Virology 64:4438; y Smerdou y Liljestrom 1999 J. Virology 73:1092.

40 En determinadas realizaciones, el ARN replicón comprende al menos una mutación atenuante. En otras realizaciones específicas, los ácidos nucleicos auxiliares incluyen, como mínimo una mutación atenuante. En realizaciones que comprenden dos moléculas de ácido nucleico auxiliar, como mínimo una molécula incluye al menos una mutación atenuante, o ambas pueden codificar como mínimo una mutación atenuante. Alternativamente, el ácido nucleico auxiliar, o al menos uno de los primeros o segundos ácidos nucleicos auxiliares incluye al menos dos, o múltiples, mutaciones atenuantes. Las mutaciones atenuantes apropiadas dependen del alfavirus utilizado. Por ejemplo, cuando el alfavirus es VEE, las mutaciones atenuantes adecuadas se pueden seleccionar del grupo que consiste en codones en la posición 76 del aminoácido E2 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, arginina o histidina como el aminoácido 76 de E2; los codones en la posición de aminoácido 120 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina como el aminoácido 120 de E2; los codones en la posición 209 del aminoácido E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina, arginina o histidina como el aminoácido 209 de E2; codones en el aminoácido 272 de E1 que especifican una mutación atenuante, preferiblemente treonina o serina como el aminoácido 272 de E1; codones en el aminoácido 81 de E1 que especifican una mutación atenuante, preferiblemente isoleucina o leucina como el aminoácido 81 de E1; y codones en el aminoácido 253 de E1 que especifican una mutación atenuante, preferiblemente serina o treonina como el  
 50 aminoácido 253 de E1. Las mutaciones atenuantes adicionales incluyen delecciones o mutaciones de sustitución en el dominio de escisión entre E3 y E2 de modo que la poliproteína E3/E2 no se escinde; esta mutación en combinación con la mutación en E1-253 es una cepa atenuada preferida. De forma similar, las mutaciones presentes en las cepas de vacunas vivas existentes, por ejemplo, la cepa TC83 (véase Kinney et al., 1989, Virology 170: 19-30, particularmente la mutación en el nucleótido 3), también se emplea ventajosamente en las partículas.

60 Cuando el alfavirus es el Arbovirus sudafricano No. 86 (S.A. AR86), las mutaciones atenuantes adecuadas se pueden seleccionar del grupo que consiste en codones en la posición 538 del aminoácido nsP1 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente isoleucina como el aminoácido 538 de nsP1; codones en la posición 304 del aminoácido E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente treonina como la posición 304 del

aminoácido E2; codones en la posición 314 del aminoácido E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente lisina como aminoácido 314 de E2; codones en la posición 376 del aminoácido E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente alanina como aminoácido 376 de E2; codones en la posición de aminoácido 372 de E2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente leucina como el aminoácido 372 de E2; codones en la posición 96 del aminoácido nsP2 que especifican un aminoácido atenuante, preferiblemente glicina como el aminoácido 96 de nsP2; y codones en la posición 372 del aminoácido nsP2 que especifica un aminoácido atenuante, preferiblemente valina como el aminoácido 372 de nsP2. Las mutaciones atenuantes adecuadas útiles en las realizaciones en las que se emplean otros alfavirus son conocidas por los expertos en la técnica.

Las mutaciones atenuantes se pueden introducir en el ARN realizando mutagénesis dirigida al sitio en el ADNc que codifica el ARN, de acuerdo con procedimientos conocidos. Véase, Kunkel, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488 (1985). De modo alternativo, pueden introducirse mutaciones en el ARN reemplazando los fragmentos de restricción homólogos en el ADNc que codifica el ARN, de acuerdo con procedimientos conocidos, o en copias de ADNc usando métodos mutagénicos de reacción en cadena de la polimerasa.

Se reconoce por los expertos en la técnica que las secuencias codificantes pueden variar debido a la degeneración del código genético y al uso del codón. Se incluyen todas las secuencias sinónimas que codifican la proteína inmunogénica u otro polipéptido o proteína de interés.

Además, los expertos en la técnica admiten que pueden existir variaciones alélicas en las secuencias codificantes que no cambian de manera significativa la actividad de las secuencias de aminoácidos de los péptidos codificados por esas secuencias. Se incluyen todas las secuencias de ADN equivalentes con respecto a un promotor.

Las técnicas estándar para clonación, aislamiento, amplificación y purificación de ADN, para reacciones enzimáticas que implican la ADN ligasa, ADN polimerasa, endonucleasas de restricción y similares, y diversas técnicas de separación son aquellas conocidas y comúnmente empleadas por los expertos en la técnica. Se describen varias técnicas estándar en Sambrook et al. (1989) Molecular Cloning, Segunda Edición, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York; Maniatis et al. (1982) Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Plainview, New York; Wu (ed.) (1993) Meth. Enzymol. 218, Parte I; Wu (ed) (1979) Meth. Enzymol. 68; Wu et al. (eds.) (1983) Meth. Enzymol. 100 y 101; Grossman y Moldave (eds.) Meth. Enzymol. 65; Miller (ed.) (1972) Experiments in Molecular Genetics, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York; Old y Primrose (1981) Principles of Gene Manipulation, University of California Press, Berkeley; Schleif y Wensink (1982) Practical Methods in Molecular Biology; Glover (ed.) (1985) DNA Cloning vol. I y II, IRL Press, Oxford, UK; Hames y Higgins (eds.) (1985) Nucleic Acid Hybridization, IRL Press, Oxford, UK; Setlow y Hollaender (1979) Genetic Engineering: Principles and Methods, vols. 1-4, Plenum Press, New York; y Ausubel et al. (1992) Current Protocols in Molecular Biology, Greene/Wiley, New York, NY. Las abreviaturas y la nomenclatura, cuando se empleen, se consideran estándares en el campo y se usan comúnmente en publicaciones profesionales tales como aquellas citadas en el presente documento.

Cuando la inmunización es el uso previsto para una composición estable para liofilización y rehidratación y almacenamiento, estas composiciones comprenden una cantidad inmunogénica de las partículas de replicón de alfavirus infecciosas, con propagación defectuosa (ARP) o partículas de alfavirus vivos, atenuados, en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Una «cantidad inmunogénica» es una cantidad de las partículas de alfavirus infecciosas que es suficiente para provocar una respuesta inmunitaria en el sujeto al que se administra la formulación farmacéutica. Se considera que es adecuada una cantidad de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^{10}$  o  $10^{11}$ , especialmente de aproximadamente  $10^6$  a aproximadamente  $10^8$ , o especialmente  $10^6$  a  $10^9$  unidades infecciosas, o se cree que las ARPs por dosis, son adecuadas dependiendo de la edad y la especie del sujeto que se está tratando. Las dosis adecuadas para partículas de alfavirus atenuados vivos pueden ser las mismas, o pueden ser de 1-2 órdenes de magnitud menores que las utilizadas para la administración de ARP. Los sujetos a los que se pueden administrar cantidades inmunogénicas de las partículas infecciosas de alfavirus con replicación defectuosa incluyen sujetos humanos y animales (por ejemplo, perro, gato, vaca, caballo, burro, ratón, hámster, monos, conejillos de indias, aves, huevos, entre otros). La administración puede realizarse por cualesquiera medios adecuados, tales como administración intraperitoneal, intramuscular, intradérmica, intranasal, intravaginal, intrarrectal, subcutánea o intravenosa.

Las composiciones inmunogénicas que comprenden las ARPs (que dirigen la expresión de la(s) secuencia(s) de interés cuando las composiciones se administran a un ser humano o animal) producidas usando los métodos descritos en este documento se pueden formular, como se describe en el presente documento, para una buena estabilidad con respecto a la liofilización, almacenamiento y reconstitución.

Las composiciones inmunogénicas que contienen ARP (o de otra manera biológicamente activas) se administran de un modo compatible con la formulación de dosificación, y en dicha cantidad que sea profiláctica y/o terapéuticamente eficaz. La cantidad a administrar que, por lo general, está en el intervalo de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^{10}$  o de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^9$  o de aproximadamente  $10^4$  a aproximadamente  $10^8$  unidades infecciosas por mL en una dosis, depende del sujeto que se va a tratar, la ruta mediante la cual se administran las ARPs, la inmunogenicidad del producto de expresión, los tipos de respuestas inmunes efectoras deseadas, y el grado de protección deseado. Las cantidades precisas del ingrediente activo

requerido para administrarse dependerán del juicio del médico, veterinario u otro profesional de la salud y pueden ser peculiares para cada individuo, pero su determinación está dentro de la habilidad de dicho profesional.

5 La vacuna u otra composición inmunogénica cabe administrarla en una sola dosis o en un programa de dosis múltiples. Un programa de dosis múltiple es aquel en el que un curso primario de vacunación puede incluir de 1 a 10 o más dosis separadas, seguido por otras dosis administradas a intervalos de tiempo posteriores según se requiera para mantener y reforzar la respuesta inmune, por ejemplo, semanalmente o de 1 a 4 meses para una segunda dosis, y si es necesario, una dosis posterior después de varios meses/años.

10 Una formulación liofilizada, o criodesecada, debería mejorar en gran medida la estabilidad de una vacuna lábil, ya que la eliminación de agua a granel reduciría la velocidad de las diversas vías de degradación que se producen en la solución (Carpenter et al., 1997; Carpenter et al. 2002; Rexroad et al., 2002). Sin embargo, a pesar de las potenciales mejoras de estabilidad en una formulación liofilizada, los excipientes estabilizantes son a menudo necesarios para proteger contra las tensiones desnaturalizantes encontradas durante la congelación, secado, almacenamiento y rehidratación (Carpenter et al., 1997; Carpenter et al., 2002). Además, la formulación debe ser fácil de liofilizar y mantener una estructura de torta aceptable sin evidencia de colapso. El cumplimiento de todos  
15 estos requisitos puede ser un ejercicio no trivial y desafiante para cualquier biomolécula. Carpenter et al. han delineado un enfoque racional y directo para desarrollar formulaciones proteicas liofilizadas estables (Carpenter et al., 2002). Sin embargo, no existe una estrategia similar desarrollada para formulaciones de ARP liofilizadas. En la década de 1960 se produjo una vacuna experimental existente contra el virus de la encefalitis equina venezolana, conocida como TC-83, que todavía se utiliza para vacunar a los investigadores contra la infección por un alfavirus, el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE); esta vacuna se almacena congelada como una preparación liofilizada, pero no hay detalles disponibles con respecto a su preparación.

20 En el presente contexto, la ARP o VRP pueden ser alfavirus vivos, atenuados o inactivados, o partículas de replicón de alfavirus. El ácido nucleico viral se puede derivar de un virus de tipo salvaje o atenuado, puede haber sido diseñado para contener una o más mutaciones atenuantes, especialmente en proteínas estructurales de virus, puede haber sido diseñado para contener y expresar una o más secuencias heterólogos (al virus parental) codificantes o no codificantes, tales como una proteína inmunoestimulante o una proteína antigénica u otra proteína biológicamente activa necesaria para la expresión en el ser humano o animal al que se administra una composición.

25 Al evaluar las tensiones individuales impuestas sobre ARP, se definió una formulación de ARP liofilizada optimizada que contenía como mínimo una sal, un azúcar y un tensioactivo. La formulación comprende el disacárido sacarosa y la proteína albúmina de suero humano (HSA). Si bien no se desea someterse a ninguna teoría específica, los inventores creen que HSA estabiliza a ARP durante la congelación, ayuda a mantener la infectividad tras la rehidratación y evita la agregación durante el almacenamiento y la subsecuente rehidratación. El Tween 80™ también se puede usar en lugar o en combinación con HSA. Los tensioactivos en la categoría general de detergentes no iónicos cabe emplearlos siempre que se determine una concentración óptima para cada detergente, porque es posible que presenten diferentes interacciones con la envoltura lipídica de los alfavirus o las ARP.

30 En general, los requisitos funcionales para las composiciones secas descritas en este documento son proporcionados por varias clases de moléculas, pero una clase puede proporcionar más de una función.

35 Los inventores han determinado que la ARP se agrega a menos que se alcance una cierta fuerza iónica en la solución (véanse las Figuras 7-10). En la Fig. 7, se realizaron mediciones de dispersión de luz dinámica en soluciones de ARP en diversas sales de diferentes fuerzas iónicas. A baja fuerza iónica, el diámetro «efectivo» de las partículas en solución es mucho mayor que 70 nm, lo que indica que las ARP se agregan. Las Figs. 8 y 9 muestran que la filtración (0,2 micras) de soluciones ARP de baja fuerza iónica dan como resultado una pérdida de infectividad de ARP concomitante con una pérdida en las cantidades del genoma, indicando de nuevo agregación ya que se supone que los agregados de ARP no pasan a través del filtro. Las Figuras 10A-B muestran que los polipéptidos y proteínas altamente cargadas mitigan la pérdida de infectividad después de la filtración. Por lo tanto, en todas las presentes formulaciones, se incluye una fuerza iónica suficiente para evitar la agregación. Sin desear estar vinculado a ninguna teoría particular, los presentes inventores creen que la agregación introduce variabilidad en la calidad de preparación a preparación, inconsistencia en la infectividad y, por ello, también en la eficacia de una vacuna u otra preparación administrada a un humano o animal que lo necesite, así como incertidumbre con respecto al control de calidad. Las estrategias y composiciones de formulación particular proporcionadas en este documento abordan estos problemas y reducen dicha inconsistencia, incertidumbre y posible ineficacia.

40 En una realización, se utiliza sulfato de sodio porque cristaliza sin problemas durante la congelación ( $T_e = -2^\circ\text{C}$ ) (Chang y Randall, 1992), facilitando así la liofilización. Se puede emplear citrato de sodio, que permanece amorfo durante la liofilización y tiene una  $T_g'$  reportada de  $-41^\circ\text{C}$  (Chang y Randall, 1992). Las formulaciones que contienen sulfato de sodio dan como resultado buenas tortas, y se observó la cristalización de la sal después de la reasociación mediante DSC. Por otra parte, determinadas formulaciones que contienen citrato de sodio colapsaron debido a su baja  $T_g'$ .

45 Un lioprotector actúa estabilizando las partículas de alfavirus o de replicón de alfavirus durante la parte de secado de un proceso de criodesecación. El lioprotector puede ser un sacárido o polioliol, por ejemplo, trehalosa, sacarosa o

rafinosa, u otro poliol hidrófilo tal como maltodextrina, fructosa, glicerol, sorbitol, inositol y manosa, entre otros, con la condición de que el lioprotector debe permanecer al menos parcialmente amorfo durante el secado. El lioprotector se agrega a la solución o dispersión acuosa que comprende las partículas de alfavirus o de replicón de alfavirus junto con la sal y el tensioactivo antes de la liofilización.

- 5 Durante el almacenamiento de las formulaciones liofilizadas a 37°C, la presencia del disacárido sacarosa en la formulación mitigaba las pérdidas en infectividad en comparación con las formulaciones sin sacarosa (Fig. 6). El Tween 80™ tuvo un notable efecto de estabilización durante el almacenamiento cuando las VRP se liofilizaron en la presencia de sacarosa, en contraste con sus propiedades potencialmente desestabilizadoras en solución y/o durante la congelación si estaban presentes en concentraciones que alterarían el alfavirus o la envoltura lipídica de ARP.
- 10 Tomando en consideración el ciclo de vida completo de una formulación liofilizada, es decir, congelación, secado, almacenamiento y rehidratación, una formulación de ARP liofilizada optimizada contendría, como mínimo, un disacárido tal como sacarosa, junto con HSA. Una sal es necesaria para evitar la agregación. La posibilidad de que las preparaciones de HSA de sangre humana estén contaminadas con patógenos transmitidos por la sangre puede resultar preocupante por su uso, por lo que una realización preferida es usar HSA recombinante o un detergente no iónico (por ejemplo, Tween 80), cuya concentración se determina cuidadosamente para minimizar o eliminar interacciones adversas del detergente con el alfavirus o la envoltura lipídica de ARP.

El material seco que contiene partículas de alfavirus o de replicón de alfavirus se dispersa con facilidad en medios acuosos, agua o soluciones como dextrosa al 5% o solución salina normal, en el caso de aplicaciones humanas o veterinarias, antes de la prueba de infectividad o administración como parte de una composición inmunogénica.

- 20 Los inventores han descubierto además que un tensioactivo, que puede ser un polipéptido, una proteína o un detergente no iónico, es importante para producir una preparación de ARP liofilizada estable. Los ejemplos de dichos polipéptidos o proteínas incluyen sulfato de protamina, albúmina de suero, gelatina y poli-L-lisina. Para las preparaciones de ARP para vacuna humana, la albúmina sérica humana es un componente en una formulación liofilizada. Para aplicaciones veterinarias, la fuente de albúmina sérica se adapta preferiblemente a la especie objetivo; por ejemplo, albúmina sérica porcina para vacunas porcinas; albúmina de suero bovina para vacunas de ganado, y así sucesivamente. Otros tensioactivos que se pueden usar en la preparación de preparaciones de VRP o alfavirus secas estables incluyen, pero no se limitan a, polisorbatos (por ejemplo, tensioactivos Tween, como Tween 20™ (monolaurato de polietileno (20) sorbitano), Tween 80™ (monooleato de polioxietilensorbitano) y polisorbato 80), Brij 35™ (poli(etoxietileno-23)lauril éter), tensioactivos de copolímeros en bloque (por ejemplo, copolímeros en bloque de óxido de propileno y tensioactivos de óxido de etileno (tales como tensioactivos Pluronic™, BASF Corporation, Mount Olive, NJ; poloxámero 188 (copolímero tribloque de la forma poli(óxido de etileno)-poli(óxido de propileno)-poli(óxido de etileno)) y lípidos tensioactivos de fuentes de mamíferos, siempre que no sean iónicos. Los ejemplos incluyen Survanta™ (Abbott Laboratories, Abbott Park, IL y Alveofact™ [Boehringer Ingelheim, Ingelheim, Alemania] y similares. Los tensioactivos utilizados en las formulaciones de rotavirus se discuten, por ejemplo, en la Patente de EE.UU. No. 6,616,931.

- Se cree que los tensioactivos protegen las proteínas y/o partículas de alfavirus y de replicón de alfavirus en solución a través de uno de dos mecanismos comunes. Primero, pueden unirse directamente a la proteína para promover la estabilización termodinámica. En segundo lugar, el tensioactivo podría competir con las moléculas proteicas por interfaces hidrófobas, como la interfaz aire-agua. Los tensioactivos compiten con las partículas del alfavirus o del replicón de alfavirus por interfaces, que son una fuente de las pérdidas de adsorción y la ubicación de los eventos de desnaturalización inducida por la superficie. Además del recipiente de la muestra (por ejemplo, vial de vidrio), los ejemplos de dichas interfaces también incluyen aire-agua, tales como aquellos encontrados durante la agitación, o agua con hielo como aquellos encontrados durante la congelación.

- Opcionalmente, los agentes diluyentes se pueden incluir para agregar volumen para estabilidad, visibilidad y facilidad de manejo, y para aumentar la temperatura de colapso.

- Los inventores han descubierto además que el contenido de humedad de las preparaciones de ARP es crítico para la estabilidad. Existe un contenido de humedad residual óptimo que es ideal para la estabilidad máxima de una preparación de vacuna particular; simplemente el secado en la mayor medida posible no siempre da como resultado una formulación con una estabilidad de almacenamiento óptima (véanse las Figs. 11 y 12). Es un desafío en un proceso de fabricación comercial controlar el contenido de humedad intermedia solo a través del propio proceso de secado. Por lo tanto, aunque el agua en sí misma puede verse como un plastificante, cabe incluir otros plastificantes reconocidos en la formulación como un sustituto de un mayor contenido de agua (Cicerone et al., 2003). Un plastificante en este contexto es cualquier componente que reduzca la Tg y preferiblemente permanezca amorfo en la composición seca. Una ventaja de otros plastificantes es que pueden dosificarse cuidadosamente en la formulación (véanse las Figs. 13 y 14). La presencia de dicho plastificante permite que la formulación seca contenga la menor cantidad de agua posible, pero con una plasticidad o movilidad molecular equiparable a una formulación con un mayor contenido de humedad residual. Los plastificantes aceptables, por lo general, se conocen en la técnica e incluyen, pero no se limitan a, glicerol, sorbitol, propilenglicol y dimetilsulfóxido (DMSO). Las combinaciones de estos tipos de moléculas pueden ser muy ventajosas. La Figura 17 muestra la mejora en la estabilidad de almacenamiento de ARP en presencia de polipropilenglicol (pesos moleculares 725 y 3500) en formulaciones

líoofilizadas que contienen glicerol.

Las composiciones proporcionadas en el presente documento preferiblemente tienen una temperatura de colapso mayor que la temperatura de almacenamiento requerida. Aunque los agentes diluyentes típicamente se utilizan para proporcionar soporte estructural a la torta liofilizada (véase más arriba), las ventajas de los agentes diluyentes poliméricos amorfos tales como dextrano o hidroxietilalmidón (HES) son que también tienen altas temperaturas de colapso durante la liofilización y tienen Tg relativamente altas (temperatura de transición vítrea) para un contenido de humedad residual dado. Alternativamente, los iones de borato, que se usan para proporcionar capacidad tampón para mantener el pH entre aproximadamente 7 y aproximadamente 9, también se pueden emplear para aumentar la temperatura de colapso y la Tg del sólido seco. Los iones de borato forman reticulaciones con grupos OH en azúcares, dando como resultado mejores propiedades de formación de vidrio (Miller et al., 1998).

Los antioxidantes se pueden agregar, además, para optimizar la estabilidad de almacenamiento, por ejemplo, metionina, trietanolamina o un tiol como la cisteína.

La estabilidad de las preparaciones de ARP, después de la congelación, depende de que tenga un excipiente estabilizante termodinámico que permanezca en la fase amorfa con la ARP. Esto se logra mediante el uso de HSA. El empleo de hidroxietil almidón como estabilizador en formulaciones de proteínas se discute en la Patente de EE.UU. No. 6,982,080. Sin desear atenerse a ninguna teoría particular, se concluye que la mejor recuperación del título de ARP, tras la congelación, requiere la presencia de un estabilizador termodinámico y un tensioactivo. La HSA en sí misma debería cumplir ambos requisitos, y los resultados en la Fig. 3 ilustran que las formulaciones que contienen HSA (A y SA) retienen la infectividad después de la congelación y la descongelación. La formulación que contiene sacarosa y HSA (SA) también retiene el título de infectividad completo, o casi completo, tras la rehidratación y la conservación a temperatura ambiente durante aproximadamente 8 horas (Figura 4). Es sorprendente que las formulaciones que contienen HES (H y SH) proporcionen además una recuperación de título de VRP de GFP completa después de la congelación y la descongelación, ya que habitualmente no se reporta que HES funcione como un tensioactivo.

Una realización alternativa comprende el uso de Tween 80™ como el tensioactivo, pero las condiciones de concentración y congelación óptimas utilizando este excipiente deben controlarse con cuidado para minimizar o eliminar las interacciones adversas de este detergente con la envoltura lipídica de partículas de alfavirus o de replicón de alfavirus.

La presente descripción proporciona métodos para preparar formulaciones para administración nasal, por vía respiratoria superior o pulmonar a través de composiciones en aerosol o nebulización u otros medios, y las formulaciones producidas por esos métodos. También se incluyen las formulaciones para administración subcutánea, intramuscular, intradérmica, intravenosa, mucosal o intraperitoneal de formulaciones líquidas (reconstituidas), con la composición específica adaptada para la vía de administración particular.

Todos los equivalentes funcionales conocidos en la técnica de métodos, materiales de partida, métodos sintéticos, formulaciones farmacéuticas y métodos de administración están destinados a ser incluidos en los presentes métodos y composiciones. Cada vez que se da un intervalo en la memoria descriptiva, por ejemplo, un intervalo de temperatura, un intervalo de tiempo o un intervalo de composición, se incluyen específicamente todos los intervalos intermedios y subintervalos, de manera que se incluyen todos los valores individuales contenidos en los intervalos dados.

En el contexto de la presente solicitud, «aproximadamente» significa el número indicado más o menos 20%, preferiblemente más o menos 10% del valor indicado. En el contexto de partículas de virus (o replicón semejante a virus o replicón del virus), aproximadamente significa más o menos la mitad de un log del valor indicado.

La formulación exacta, la vía de administración y la dosificación de una composición (seca, reconstituida o preparada para administración en aerosol o nebulizada) como se describe en el presente documento se pueden elegir por el médico individual en vista del estado, tamaño y edad del paciente (véase, por ejemplo, Fingl et al., en *The Pharmacological Basis of Therapeutics*, 1975, Capítulo 1 página 1).

Cabe señalar que el médico tratante sabe cómo y cuándo terminar, interrumpir o ajustar la dosis y/o el horario debido a toxicidad, disfunciones orgánicas o respuesta inmunológica exitosa. Por el contrario, el médico tratante también sabe ajustar el tratamiento a niveles más altos si la respuesta inmunológica o de otro tipo no es adecuada (lo que excluye la toxicidad). Además, la dosis y/o la frecuencia de la dosis varían de acuerdo con la edad, peso corporal y respuesta del paciente individual. También se aplican consideraciones similares en la medicina veterinaria.

Dependiendo de la condición específica que se trate o los patógenos particulares para los que se desea una respuesta inmune, y el método de selección, se puede formular y administrar una composición inmunogénica que comprende una preparación de partículas de alfavirus o de replicón de alfavirus como el ingrediente activo, por ejemplo, mediante administración mucosal, intradérmica, subcutánea o intramuscular. Las técnicas para formulación y administración son bien conocidas en la técnica.

Para inyección, la composición inmunogénica se puede reconstituir en soluciones acuosas, preferiblemente en

tampones fisiológicamente compatibles como solución de Hanks, solución de Ringer, agua para irrigación o tampón salino fisiológico. Los adyuvantes inmunológicos se pueden incorporar antes de la liofilización, durante o después de la reconstitución de una preparación criodesecada. Alternativamente, una proteína que funciona como un adyuvante inmunológico (por ejemplo, interleucina-12) se puede codificar por partículas de replicón de alfavirus incluidas dentro de la composición inmunológica, o añadidas a la misma.

El uso de vehículos aceptables, desde el punto de vista farmacéutico, para formular los compuestos descritos en este documento en dosificaciones adecuadas para administración sistémica está dentro del alcance de la presente descripción. Con la elección correcta del vehículo y la práctica de fabricación adecuada, las composiciones, en particular aquellas formuladas y/o reconstituidas como soluciones, se pueden administrar por vía parenteral, tal como la inyección intravenosa. Los compuestos apropiados se pueden formular con facilidad usando vehículos farmacéuticamente aceptables bien conocidos en la técnica en dosificaciones adecuadas para administración oral. Dichos vehículos permiten que los presentes compuestos se formulen como comprimidos, píldoras, cápsulas, líquidos, geles, jarabes, suspensiones espesas, suspensiones y los similares, para ingestión oral por el paciente a tratar.

Cada formulación o combinación de componentes descritos o ejemplificados se puede utilizar para practicar la invención, a menos que se indique lo contrario. Se pretende que los nombres específicos de los compuestos sean ilustrativos, ya que se sabe que un experto en la técnica puede nombrar los mismos compuestos de forma diferente. Cuando se describe un compuesto en este documento, como un isómero o enantiómero particular del compuesto, no se especifica, por ejemplo, en una fórmula o en un nombre químico, sino que se pretende que esa descripción incluya cada isómero y enantiómero del compuesto descrito individual o en cualquier combinación. Un experto en la técnica apreciará que los métodos, reactivos, métodos sintéticos y otros componentes, además de los específicamente ejemplificados, se pueden emplear en la práctica de la invención sin recurrir a una experimentación indebida. Todos los equivalentes funcionales conocidos en la técnica, de cualquiera de estos métodos, reactivos, métodos sintéticos y similares están destinados a ser incluidos dentro del alcance de esta invención. Cuando se da un intervalo en la memoria descriptiva, por ejemplo, un intervalo de temperatura, un intervalo de tiempo o un intervalo de composición, todos los intervalos intermedios y subintervalos, así como todos los valores individuales incluidos en los intervalos dados, están destinados a ser incluidos en la divulgación.

Como se utiliza en el presente documento, «que comprende» es sinónimo de «que incluye», «que contiene», o «caracterizado por», y es inclusivo o abierto y no excluye elementos o etapas de métodos adicionales no enumerados. Como se utiliza en este documento, «que consiste en» excluye cualquier elemento, etapa o ingrediente no especificado en el elemento de la realización. Como se utiliza en este documento, «que consiste esencialmente en» no excluye materiales o etapas que no afectan materialmente las características básicas y novedosas de la realización. Se entiende que cualquier mención hecha en este documento del término «que comprende», en particular en una descripción de componentes de una composición o en una descripción de elementos de un dispositivo, abarca las composiciones y métodos que consisten esencialmente en y que consisten en los componentes o elementos enumerados. La invención descrita, a modo ilustrativo en este documento se puede poner en práctica adecuadamente en ausencia de cualquier elemento o elementos, limitación o limitaciones que no se describan específicamente en este documento.

Los términos y expresiones que se han empleado se utilizan como términos de descripción y no de limitación, y no hay intención en el uso de dichos términos y expresiones de excluir equivalentes de las características mostradas y descritas o porciones de las mismas, pero se reconoce que son posibles diversas modificaciones dentro del alcance de la invención reivindicada. Por lo tanto, debe entenderse que, aunque la presente invención se ha divulgado específicamente mediante realizaciones preferidas y características opcionales, los expertos en la técnica pueden recurrir a la modificación y variación de los conceptos divulgados en este documento, y que se considera que dichas modificaciones y variaciones están dentro del alcance de esta invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

En general, los términos y frases utilizadas en este documento tienen su significado reconocido en la técnica, que se puede encontrar haciendo referencia a documentos estándar, referencias de revistas y contextos conocidos por los expertos en la técnica.

Todas las referencias de patentes y no patentes citadas en este documento reflejan el nivel de experiencia en la(s) técnica(s) relevante(s) para la presente invención.

Aunque la descripción en el presente documento contiene cierta información específica y ejemplos, estos no deben interpretarse como limitantes del alcance de la invención, sino solo como ilustraciones de algunas de las realizaciones actualmente preferidas de la invención. Por ejemplo, el alcance de la invención debería determinarse por las reivindicaciones adjuntas y sus equivalentes, en lugar de por los ejemplos dados en este documento a continuación.

## Ejemplos

### Ejemplo 1

Se evaluaron varios tipos de excipientes para examinar su capacidad para estabilizar GFP VRP durante la congelación, secado, almacenamiento a 37°C y rehidratación.

#### Reactivos

5 Se obtuvieron sacarosa, dextrano (MW promedio 40 kDa), Tween 80™ y manitol de Spectrum Chemical, Gardena, CA. El sulfato de sodio se adquirió de JT Baker, Phillipsburg, NJ. El citrato de sodio, HES (solución al 6% en NaCl al 0,9%) y los cristales de Tris preestablecidos a pH 7,4 se obtuvieron de Sigma (St. Louis, MO). Una solución al 25% de HSA (Buminat™, Baxter Healthcare Corp. Westlake Village, CA) y agua para irrigación (WFI) se obtuvieron de Baxter. Según su disponibilidad, todos estos reactivos tuvieron un grado mínimo de NF.

10 Para el ensayo de cuantificación del genoma, se obtuvo agua de uso en biología molecular de Eppendorf. Se compraron tampón Tris-EDTA (TE) 1X, pH 8,0, y una solución de SDS al 10% de Ambion. La Mezcla Maestra Universal RT se obtuvo de Applied Biosystems, Foster City, CA, y los cebadores NSP2 y la sonda se compraron de Biosearch Technologies, Novato, CA.

#### Componentes de la formulación

15 Se realizaron estudios sobre formulaciones de una ARP basada en el virus de la encefalitis equina venezolana, es decir, una VRP, que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) en el replicón de ARN. Los materiales de partida para estos estudios fueron VRP purificada que codifica GFP («GFP VRP») en fosfato sódico 10 mM, NaCl 0,8 M, pH 7,3. En la figura 1 se muestra un gel de SDS-PAGE teñido con plata de este material. Las proteínas constituyentes de VRP se muestran claramente. Se diluyeron alícuotas de esta solución madre directamente en cada tampón de formulación con el objetivo de obtener un título de VRP de  $2 \times 10^8$  unidades infecciosas por ml (IU/ml). Se supuso que las cantidades de fosfato sódico residual y de NaCl introducidas en estas alícuotas por la solución madre de VRP no diluida eran insignificantes considerando el alcance de la dilución realizada durante la formulación (aproximadamente 300 veces). Las formulaciones que contenían 1% de HES contenían una concentración aproximadamente 25 mM de NaCl aportado por el 0,9% de NaCl en la solución madre de HES. Todos los tampones de formulación contenían Tris 10 mM y tenían un pH de  $7,4 \pm 0,1$ . Cuando fue necesario, el pH se ajustó con alícuotas concentradas de NaOH o HCl para caer dentro del intervalo deseado; las cantidades de ácido/base utilizadas fueron lo bastante bajas como para no aumentar significativamente la cantidad de NaCl en las formulaciones. Los títulos iniciales se midieron justo después de la formulación.

#### Liofilización

30 Las formulaciones con y sin GFP VRP se liofilizaron en este estudio. Aquellas sin VRP (placebos) se usaron para el análisis de humedad posterior a la liofilización. Como la cantidad de VRP en cada vial fue inferior a un microgramo, se supone que la contribución de VRP al contenido de humedad final es insignificante. Se pipetearon VRP y placebos formulados (0,5 ml) dentro de viales de vidrio de borosilicato Tipo I de 2 ml (Kimble) y se colocaron en estantes preenfriados (5°C) en un criodesecador FTS LyoStar™ II (Stone Ridge, NY). Después de equilibrar los viales a 5°C durante 30 minutos, se logró la congelación al enfriar los estantes a 1°C/min a -50°C. Luego las muestras se sometieron a tratamiento térmico durante 15 minutos a -20°C min para permitir la cristalización de sulfato de sodio. El estante se mantuvo entonces a -47°C durante 2 h. Aproximadamente a 1 h en esta etapa de retención, se retiró y descongeló un vial por formulación para evaluar los efectos de la congelación/descongelación. Para los viales restantes, la temperatura del estante se elevó a -45°C, donde el secado primario se produjo a 40 mTorr durante 64 h. El secado secundario se produjo al elevar la temperatura del estante a -20°C a 0,5°C/min (40 mTorr) y, luego, a +20°C a 0,5°C/min (200 mTorr) seguido por mantenimiento a +20°C durante 3 h. Como la Tg' de la formulación que contiene citrato fue de -44°C, se utilizó un ciclo relativamente largo con una temperatura muy baja para el secado primario. Al finalizar el ciclo, la temperatura del estante se mantuvo a 0°C hasta que los viales se taponaron al vacío (FluroTec™ 4432/50 tapones para liofilización gray Iyo, West), se retiraron del criodesecador y se sellaron con un sello de aluminio. El contenido de agua de cada formulación se determinó mediante titulación coulométrica de Karl Fischer.

#### Estabilidad de las formulaciones

50 Inmediatamente después de la retirada del criodesecador, se reconstituyeron los viales a t0 (tiempo cero) con 0,5 ml de WFI y se ensayaron para determinar el título. Para evaluar la estabilidad después de la rehidratación, los títulos también se determinaron aproximadamente cuatro y ocho horas más tarde mientras se mantenía a temperatura ambiente. Para evaluar la estabilidad de almacenamiento, los viales liofilizados se almacenaron a 37°C. Además, se almacenó a 2-8°C un vial no liofilizado por formulación.

#### Ensayo de infectividad in vitro (IFA)

55 Se usó un ensayo de infectividad *in vitro* usando células Vero para medir el título de potencia de GFP VRP. Las células Vero infectadas expresan el gen GFP, permitiendo que las células infectadas se visualicen con un microscopio fluorescente. Las células Vero se sembraron en medio de crecimiento Vero (VGM, medio esencial mínimo con sales de Earle y L-glutamina enriquecido con aminoácidos no esenciales y FBS al 5%) a  $8 \times 10^4/0,5$  ml/pocillo en una placa de 48 pocillos. Las muestras de GFP VRP se diluyeron en serie en VGM con una dilución

mínima de 10 veces para cada muestra. En el momento del ensayo, se retiró VGM del pocillo y se reemplazó por 120  $\mu$ l de la muestra infectante de GFP VRP. Se infectaron tres pocillos por muestra por dilución. Cada placa también contenía tres pocillos infectados con una muestra control almacenada a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Las placas se incubaron durante la noche a  $37^{\circ}\text{C}$ , 5% de  $\text{CO}_2$ . Al día siguiente, se enumeraron las células fluorescentes verdes a una dilución que contenía 10-80 células por campo en el objetivo del microscopio 10X, que está en el intervalo lineal del ensayo. Se contaron cinco campos por pocillo, a menos que el título de la muestra fuera muy bajo a la dilución más baja, en cuyo caso se contó todo el pocillo. Para obtener un título en unidades infecciosas (IU) por ml, los recuentos se extrapolaron al número de campos por pocillo y se corrigieron para el factor de dilución. Las pérdidas en la infectividad GFP VRP durante el procesamiento y el almacenamiento se calcularon así mediante la comparación del título medido de la muestra con el título del control a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se calcularon intervalos de confianza del 95% para los  $n = 15$  recuentos de células por muestra.

#### Ensayo de diversas formulaciones

Se evaluaron las funciones de diferentes componentes en la estabilidad de doce formulaciones de ARP liofilizadas. La Tabla 1 resume la composición de las doce formulaciones seleccionadas para este estudio. Todas las formulaciones contenían Tris como el tampón para evitar cambios de pH durante la congelación (Anchordoquy y Carpenter, 1996), y se eligió un pH de 7,4 ya que esta es una condición de pH óptima para la estabilidad de la ARP en solución. Se estudiaron diversos excipientes para identificar formulaciones óptimas, incluyendo un azúcar (el disacárido sacarosa), agentes diluyentes amorfos (dextrano, HES, HSA), un agente diluyente cristalino (manitol) y un tensioactivo no iónico (Tween 80<sup>TM</sup>).

#### Calorimetría diferencial de barrido (DSC)

El análisis térmico de las soluciones y sólidos secados se realizó usando un calorímetro diferencial de barrido TA Q100 (New Castle, DE). Para el análisis de las soluciones, se sellaron 10  $\mu$ l en una bandeja de aluminio. Se utilizó una bandeja vacía como referencia. Las muestras se congelaron ajustando la temperatura de la celda a  $-80^{\circ}\text{C}$ , y la congelación de las muestras se verificó mediante la observación del evento de cristalización exotérmica de hielo. Las muestras se sometieron a tratamiento térmico luego durante 15 minutos a  $-20^{\circ}\text{C}$ . A continuación, las muestras se equilibraron a  $-70^{\circ}\text{C}$  durante 3 minutos y se barrieron de  $+20^{\circ}\text{C}$  a  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . Para el análisis de los sólidos secados, se sellaron muestras de aproximadamente 2-5 mg de sólido cada una en una bandeja de aluminio con una bandeja vacía utilizada como la referencia. Las muestras se calentaron a través de la transición vítrea, se enfriaron y después se volvieron a calentar a  $190^{\circ}\text{C}$ . Todos los pasos de calentamiento y enfriamiento se realizaron a  $10^{\circ}\text{C}/\text{min}$ . La reversibilidad de la temperatura de transición vítrea se verificó mediante la observación del cambio de etapa durante la etapa de enfriamiento. Las temperaturas de transición vítrea se midieron como el punto medio de la transición de referencia de segundo orden observada durante la segunda etapa de calentamiento.

#### Ensayo de cuantificación del genoma

Las muestras de VRP se diluyeron en tampón TE 1X a una concentración estimada de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^7$  IU/ml en base a los valores determinados por el IFA. Se prepararon dos diluciones para cada muestra. A continuación, se añadieron 20  $\mu$ l de cada dilución a 20  $\mu$ l de una solución de SDS al 0,2% y se lisaron durante 10 min en un baño de agua a  $60^{\circ}\text{C}$ . Después de la lisis, las muestras se enfriaron a temperatura ambiente, se diluyeron 1:100 en agua de uso en biología molecular, y se cuantificó la cantidad de genomas de VRP presentes en cada muestra mediante qPCR. Se añadió una alícuota de 5  $\mu$ l de cada muestra lisada y diluida a 20  $\mu$ l de una mezcla de PCR compuesta de mezcla maestra Universal RT 1X y 200 nM de un cebador directo, cebador inverso y una sonda marcada con 6-FAM. Los dos cebadores y la sonda se diseñaron para detectar una región de la secuencia de un gen de proteína no estructural (NSP2) presente en todos los genomas de VRP.

Las secuencias de cebador fueron las siguientes: cebador directo, SEQ ID NO: 1, CAAAAGCATCTCTCGCCGTTG; cebador inverso, SEQ ID NO: 2, TCTCTTTCGGATTCGTCGTTCTC; y sonda, SEQ ID NO: 3, TCTGTGACTTCGGTCGTCTCAACCTTGTT.

El ciclo de PCR se inició con un mantenimiento a  $48^{\circ}\text{C}$  durante 30 min para generar cDNA y un mantenimiento a  $95^{\circ}\text{C}$  en 10 min para activar la polimerasa, y fue seguido por una repetición de 40 ciclos de 15 segundos a  $95^{\circ}\text{C}$ , 60 segundos a  $60^{\circ}\text{C}$ . La amplificación se realizó en un sistema de detección de secuencia rápida Applied Biosystems 7500 (versión de software 1.3.1) que mide la intensidad de señal fluorescente de cada muestra durante el ciclo de PCR y la revela como un valor de umbral de ciclo (Ct). El valor de Ct de cada muestra se comparó con los valores de Ct de los estándares de ARN a concentraciones conocidas para determinar las cantidades de genoma de cada muestra. Los estándares de ARN para el ensayo se generaron usando un ARN monocatenario transcrito de un plásmido que contiene el gen NSP2. La precisión del instrumento es tal que se pueden detectar diferencias de dos veces en las cantidades del genoma con una fiabilidad del 99,7% (Applied Biosystems, 2006).

#### Análisis DSC de formulaciones congeladas

Los valores  $T_g'$  de las formulaciones obtenidas por DSC se resumen en la Tabla 2. La  $T_g'$  de la formulación B1 fue  $-44^{\circ}\text{C}$ , lo que condujo a la selección de un ciclo de liofilización conservador con el fin de evitar el colapso de esta

formulación durante la liofilización. No se observó transición vítrea para B2, presumiblemente debido a la cristalización del sulfato de sodio. La adición de sacarosa (formulación S) inhibió la cristalización del sulfato de sodio como se muestra en la Fig. 2 (barrido inferior). Sin tratamiento térmico, se observó un vidrio metaestable con una Tg' de aproximadamente -40°C que cristaliza durante el calentamiento por encima de la transición vítrea como se evidencia mediante la exotermia. Después de incorporar una etapa de tratamiento térmico de 15 minutos a -20°C, no se observó exotermia por cristalización y se supuso que la Tg' observada a -35°C era la de sacarosa sola (Fig. 2 barrido superior). Todos los valores proporcionados en la Tabla 2 son de barridos en los que se realizó el tratamiento térmico; no se observó comportamiento de vidrio metaestable ni exotermias por cristalización en ninguno de estos barridos. Para respaldar adicionalmente la conclusión de que el tratamiento térmico condujo a la cristalización del sulfato de sodio, se obtuvieron los valores de Tg' para las formulaciones preparadas sin sal. No se observó comportamiento de vidrio metaestable y los valores de Tg' de las fases amorfas se mantuvieron esencialmente sin cambios con respecto a los obtenidos con sal (Tabla 2).

#### Propiedades de las formulaciones criodesecadas

El examen visual de diversas formulaciones que contenían sulfato no reveló ninguna evidencia de colapso de la torta después de la liofilización. Por otro lado, la formulación que contiene citrato (B1) colapsó, a pesar del uso de un ciclo de baja temperatura diseñado para evitar dicho colapso. Por lo tanto, la selección de sal y el ciclo de temperatura de criodesecación se deben elegir con precaución para eliminar (o minimizar) dicho colapso.

La Tabla 3 resume los contenidos de humedad residual medidos después de la liofilización. La humedad residual fue muy alta para la formulación B1 (> 10%), presumiblemente como resultado del colapso de esta formulación. Para todas las demás formulaciones, las humedades residuales fueron más altas de lo que se recomienda normalmente (aproximadamente 1% o menos) (Carpenter et al., 1997; Carpenter et al., 2002; Tang y Pikal, 2004), en especial para aquellas formulaciones que contienen un agente diluyente amorfo sin sacarosa (D, A, H). La Tabla 3 también enumera las temperaturas de transición vítrea (Tg) de los sólidos secos según lo determinado por DSC. No se detectó una transición vítrea en las formulaciones que contienen dextrano, HSA o HES como el único excipiente amorfo (D, A, H), lo que no es inusual. Los formadores de vidrio fuerte típicamente exhiben pequeños cambios en la capacidad calorífica en la transición vítrea, que a menudo son difíciles de detectar (Hancock y Zografi, 1997). Las formulaciones que contenían sacarosa sola (S) y sacarosa con Tween 80 (ST) tenían valores de Tg similares (35°C y 33°C, respectivamente). La adición de polímeros grandes aumentó la Tg como se esperaba. Sin embargo, todos los valores medidos de Tg fueron de menor magnitud a lo esperado. Una posible explicación es el contenido de humedad relativamente alto de estas formulaciones. El agua es un plastificante de vidrio bien conocido que reduce de manera drástica la Tg (Hancock y Zografi, 1994). Además, la humedad residual real de la fase amorfa es en realidad más alta que la medida por la titulación de Karl Fischer para toda la torta. Se proporcionó sulfato de sodio como un cristal anhidro antes de la liofilización, y suponiendo que permanezca así después de la liofilización, toda el agua residual se asociaría con la fase amorfa.

#### Estabilidad después de la congelación

Se retiró un vial de cada formulación del criodesecador antes del inicio del secado primario y se descongeló a temperatura ambiente. Una vez descongeladas, las formulaciones se analizaron inmediatamente para determinar la infectividad. La figura 3 ilustra las pérdidas en el título de infectividad de GFP VRP después de las etapas de congelación y descongelación. Las pérdidas más grandes en infectividad se midieron en las formulaciones que contienen manitol y/o sulfato de sodio (M, B2), que cristalizan durante la congelación según la Tabla 2. En estas formulaciones, no hay excipiente disponible en la fase que contiene la VRP para proporcionar crioprotección. La adición del tensioactivo Tween 80™ a la formulación solo con sulfato (T) dio como resultado una recuperación del título más alta con respecto a la formulación B2, pero la pérdida todavía estaba en el orden de un logaritmo. Las formulaciones que contenían un excipiente amorfo exhibieron las menores pérdidas en el título tras la congelación y la descongelación; estos excipientes permanecieron en la misma fase que la VRP durante la congelación.

#### Estabilidad después de la liofilización

La Fig. 3 ilustra las pérdidas en el título de infectividad de GFP VRP después de la liofilización. En la mayoría de los casos, las pérdidas fueron mayores que las obtenidas tras la simple congelación, lo que confirma que el secado es un estrés adicional para GFP VRP después de la congelación. Las únicas formulaciones que no exhibieron pérdidas significativas en el título tras el proceso de liofilización fueron las que contienen HAS (A y SA).

#### Estabilidad en la solución

Para evaluar la estabilidad después de la rehidratación, se determinaron los títulos de infectividad al retirarlos del criodesecador, y de nuevo durante aproximadamente 4 y 8 horas después de la rehidratación. Los viales permanecieron a temperatura ambiente entre esos intervalos de tiempo. La Fig. 4A muestra las pérdidas en el título de infectividad a lo largo del tiempo. Los datos muestran, sin género de dudas, que todas las formulaciones son relativamente lábiles en solución a temperatura ambiente en el transcurso de 8 horas. El control no liofilizado a -80°C exhibió la mejor estabilidad, junto con la formulación liofilizada SA. SA fue una de las dos formulaciones que mantuvieron el título durante el proceso de liofilización. Además, con la excepción de la formulación SA, todas las

formulaciones perdieron el título a temperatura ambiente con mayor rapidez después de la liofilización y la rehidratación, en comparación con el control no liofilizado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

La estabilidad de GFP VRP en solución se demuestra en la Fig. 5. Los viales no liofilizados se almacenaron a  $2-8^{\circ}\text{C}$  durante un mes. Las muestras se volvieron a estudiar por la infectividad y se sometieron a un análisis de qPCR para medir las cantidades de genoma (GQ). Los resultados de IFA y qPCR de estas muestras almacenadas se compararon con los valores respectivos obtenidos inmediatamente después de la formulación. Tanto los títulos de infectividad como el GQ disminuyeron de modo significativo para la mayoría de las formulaciones, lo que indica que las partículas del replicón del virus GFP se pierden en la superficie del vial durante el almacenamiento a largo plazo en la solución. Además, las pérdidas en infectividad son mayores que las pérdidas en GQ, lo que sugiere que la adsorción al vial no es la única vía de degradación que ocurre en la solución. Las formulaciones con HSA (A y SA) tuvieron pérdidas mínimas en GQ, lo que significa que la HSA puede funcionar como un tensioactivo que minimiza la pérdida de GFP VRP en la superficie del vial de vidrio.

#### Estabilidad durante el almacenamiento

Las formulaciones de GFP VRP purificadas se almacenaron a  $37^{\circ}\text{C}$  con el fin de evaluar su capacidad para mantener la infectividad con el paso del tiempo. En diversos puntos de tiempo, los viales se retiraron del almacenamiento, se rehidrataron con 0,5 ml de WFI, y se analizaron inmediatamente mediante IFA.

La Fig. 6 representa las pérdidas en los títulos de infectividad durante el almacenamiento a  $37^{\circ}\text{C}$  en el transcurso de 14 días, y la Tabla 4 refleja las pérdidas en el punto de tiempo a los 14 días en comparación con el título inicial obtenido justo después de la liofilización. Además de exhibir diferencias en la recuperación del título tras la liofilización, las formulaciones también exhibieron distintos perfiles de estabilidad durante el almacenamiento a  $37^{\circ}\text{C}$ . Al cabo de 7 días de almacenamiento, las formulaciones B1, B2, M y T habían perdido toda su infectividad. Según la Fig. 3, estas estuvieron entre las formulaciones que se desestabilizaron más durante la congelación-descongelación y la criodesecación. La falta de crioprotectores y lioprotectores adecuados en la formulación impusieron cambios severos en la GFP VRP durante la liofilización que hace que las partículas sean extremadamente inestables a  $37^{\circ}\text{C}$ . El elevado contenido de humedad de la formulación B1 y su colapso pueden haber contribuido de manera adicional a su inestabilidad.

La formulación A mantuvo el título durante la liofilización (Fig. 3), aunque era inestable en el almacenamiento (Fig. 6, Tabla 4). Después de la inclusión de sacarosa, esta formulación (SA) mostró una mejor estabilidad al almacenamiento. El examen adicional de la Fig. 6 y la Tabla 4 revela que las formulaciones con las menores pérdidas en el título durante el almacenamiento a  $37^{\circ}\text{C}$  fueron aquellas que contenían sacarosa, sugiriendo que se requiere un disacárido para la estabilidad de almacenamiento óptima de un ARP liofilizado.

La formulación que perdió la menor cantidad de infectividad durante el almacenamiento a  $37^{\circ}\text{C}$  fue la que contenía sacarosa y Tween 80™ (formulación ST). Aunque esta formulación particular sí sufrió una caída significativa en el título después de la liofilización (véase la Fig. 3), la mejora en la estabilidad de almacenamiento usando Tween 80™ es beneficiosa.

Los datos en la Fig. 6 muestran que el estado vítreo de la formulación no afecta la estabilidad de almacenamiento a  $37^{\circ}\text{C}$ . Por ejemplo, según la Tabla 3, ambas formulaciones S y ST se almacenaron por encima de sus valores de  $T_g$  cuando se almacenaron a esta temperatura. Sin embargo, estas dos formulaciones no solo exhiben diferentes perfiles de estabilidad, sino que la formulación ST también fue la formulación estudiada más estable. Se observa que a pesar del almacenamiento por encima de  $T_g$  para las formulaciones S y ST, los estudios de DSC no revelaron ninguna cristalización de sacarosa durante el almacenamiento. Se ha demostrado que la cristalización de sacarosa durante el almacenamiento por encima de  $T_g$  en determinadas formulaciones de proteínas es un evento desestabilizador (Kreilgaard et al., 1998b; Kreilgaard et al., 1999; Garzon-Rodriguez et al., 2004).

En ciertos casos, el mantenimiento por debajo de  $T_g$  es una condición importante para la estabilidad de almacenamiento (Kreilgaard et al., 1998b; Kreilgaard et al., 1999; Garzon-Rodriguez et al., 2004). Sin embargo, estudios recientes que examinaron las funciones de los enlaces de hidrógeno de los disacáridos y los efectos de los plastificantes sobre las relajaciones locales en los vidrios han demostrado que la diferencia relativa entre la  $T_g$  y la temperatura de almacenamiento no siempre es un determinante suficiente para la estabilidad (Kreilgaard et al., 1998b; Kreilgaard et al., 1999; Cicerone et al., 2003; Cicerone et al., 2004; Garzon-Rodriguez et al., 2004; Chang et al., 2005). Además, las vías de degradación química, que pueden implicar la difusión de reactivos muy pequeños como el agua, están fuertemente desacoplados de la dinámica de la matriz vítrea (Oksanen y Zografi, 1993; Pikal, 1999; Yoshioka et al., 2000; Breen et al., 2001; DePaz et al., 2002). Los resultados de almacenamiento a  $37^{\circ}\text{C}$  presentados aquí sugieren que la(s) vía(s) de degradación para VRP a  $37^{\circ}\text{C}$ , al menos la(s) que afectan la infectividad, no están acopladas a la dinámica de la fase amorfa.

Se evaluaron los efectos de la criodesecación y el almacenamiento sobre la tendencia de la ARP a agregarse tras la rehidratación. Después de 14 días de almacenamiento a  $37^{\circ}\text{C}$ , se filtraron 200  $\mu\text{l}$  de cada formulación rehidratada a través de una membrana de polietersulfona de 0,2  $\mu\text{m}$ . Los valores de GQ medidos para el filtrado se compararon entonces con los obtenidos antes de la filtración. La Tabla 5 muestra que todas, a excepción de tres formulaciones,

tenían al menos una disminución de dos veces (-0,3 log) en GQ después de la filtración, lo que sugiere que la VRP se había agregado en estas formulaciones. No se observó evidencia de agregación por esta evaluación en las formulaciones A, SA y ST, todas las cuales contienen un tensioactivo. Sin embargo, la formulación T, que también contenía un tensioactivo, parecía contener VRP agregado.

#### 5 Ejemplo 2

10 Un ARP basado en el virus de la encefalitis equina venezolana, es decir, una VRP que expresa la cadena pesada de neurotoxina botulínica tipo B (BoNT/B Hc) en el replicón de ARN, se liofilizó en la presencia de fosfato de sodio, sacarosa, HSA y cloruro de sodio (tampón, azúcar, tensioactivo, sal). La Fig. 15 representa los datos de infectividad durante el almacenamiento en condiciones de congelación y refrigeración (-20°C y 2-8°C, respectivamente). En condiciones de congelación, la infectividad disminuyó de modo muy leve (<0.2 log) transcurridos casi dos años. Bajo condiciones de refrigeración, la infectividad cayó menos de 1 log después de casi dos años.

#### Ejemplo 3

15 Se liofilizó una ARP basada en el virus de la encefalitis equina venezolana, es decir, una VRP, que expresa la proteína verde fluorescente (GFP) en el replicón de ARN en la presencia de fosfato de sodio, sacarosa, HSA, sulfato de sodio, metionina (1 mM) y glicerol (tampón, azúcar, tensioactivo, sal, antioxidante, plastificante). La Fig. 16 representa los datos de infectividad durante el almacenamiento bajo condiciones de congelación y refrigeración (-20°C y 2-8°C, respectivamente). Bajo condiciones tanto de congelación como de refrigeración, la infectividad se mantuvo esencialmente sin cambios después de seis meses, seguida de una disminución de aproximadamente 0,5 log cuando se evaluó la estabilidad durante doce meses. Aunque la metionina puede estar presente, se cree que no es necesaria para la estabilidad.

20 Las Figs. 16B-16C grafican los datos de infectividad cuando esta misma matriz se usa para formular una ARP basada en el virus de la encefalitis equina venezolana, es decir, una VRP que expresa proteína de superficie de hemaglutinina (HA) del virus de influenza (A/WY H3) en el replicón de ARN de dos procesos de producción separados. En el primer lote, bajo condiciones de congelación, la infectividad permaneció esencialmente sin cambios, y bajo condiciones de refrigeración, la infectividad disminuyó -0,3 log después de doce meses de almacenamiento (Fig. 16B). En el segundo lote, bajo condiciones de congelación, la infectividad se ha mantenido en esencia sin cambios, y bajo condiciones de refrigeración, la infectividad ha disminuido -0,2 log después de seis meses de almacenamiento (Fig 16C).

#### Ejemplo 4

30 Una ARP basada en el virus de la encefalitis equina venezolana, es decir, una VRP que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) en el replicón de ARN se liofilizó en la presencia de fosfato de sodio, sacarosa, HSA, sulfato de sodio y metionina (tampón, azúcar, tensioactivo, sal, antioxidante) y en la presencia o ausencia de glicerol y polipropilenglicol 725 y 3500. La Fig. 17 representa los datos de infectividad durante el almacenamiento a temperatura ambiente. Después de seis meses, la pérdida de infectividad es mayor en la muestra que carece de glicerol y polipropilenglicol. La adición de glicerol solo atenúa la pérdida de infectividad. La adición, tanto de glicerol como de polipropilenglicol resulta en una estabilidad mejorada en comparación con el uso de glicerol solo, con polipropilenglicol 725 que aumenta la estabilidad en mayor medida que el polipropilenglicol 3500.

#### Ejemplo 5

40 Una ARP basada en el virus de la encefalitis equina venezolana, es decir, una VRP, que expresa la proteína fluorescente verde (GFP) en el replicón de ARN se liofilizó en presencia de fosfato de sodio, sacarosa, HSA, sulfato de sodio y glicerol (tampón, azúcar, tensioactivo, sal, plastificante). La Fig. 18 refleja los datos de infectividad durante el almacenamiento a temperatura ambiente en presencia o ausencia de tetraborato de sodio. Tras cuatro meses de almacenamiento, es evidente el efecto de estabilización del tetraborato de sodio.

#### Ejemplo 6

45 Una ARP basada en el virus de la encefalitis equina venezolana, es decir, una VRP, que expresa GFP en el replicón de ARN, se purificó por recolección y filtración de flujo tangencial (véase Reap et al. y Talarico et al. para más detalles). La preparación de VRP, parcialmente purificada, se dividió en alícuotas y se sometió a cromatografía en sulfato de Cellufine™ bajo una variedad de condiciones de elución para proporcionar VRP purificada, desprovista de cloruro de sodio, para mejorar la estabilidad y el procesamiento durante las operaciones de liofilización.

50 Una porción del material parcialmente purificado se purificó adicionalmente de acuerdo con los métodos actuales (véase Reap et al., Talarico et al.) usando tampones que contienen cloruro de sodio. El contenido de cloruro de sodio de la VRP purificada en este proceso fue de aproximadamente 800 mM. Se realizaron dos procedimientos adicionales, cada uno conteniendo diferentes protocolos de lavado intermedio, en los que la VRP purificada resultante estaba desprovista de cloruro de sodio, pero contenía sulfato de sodio 500 mM. La recuperación de VRP de la elución de sulfato fue ligeramente menor que la correspondiente a la VRP eluida con cloruro de sodio. La pureza de la VRP fue esencialmente equivalente entre operaciones. Los resultados de los diferentes esquemas de

elución de sulfato de Cellufine™ se muestran en la Tabla 6.

### Bibliografía

1. Allison SD, Randolph TW, Chang BS, Carpenter JF. 1999. Hydrogen bonding between sugar and protein is responsible for inhibiting dehydration-induced protein unfolding. *Arch. Biochem. Biophys.* 365: 289-298.
- 5 2. Anchordoquy TJ, Carpenter JF. 1996. Polymers protect lactate dehydrogenase during freeze-drying by inhibiting dissociation in the frozen state. *Arch. Biochem. Biophys.* 332: 231-238.
3. Anchordoquy TJ, Armstrong TK, Molina MC. 2005. Low molecular weight dextrans stabilize nonviral vectors during lyophilization at low osmolalities: concentrating suspensions by rehydration to reduced volumes. *J. Pharm. Sci.* 94: 1226-1236.
- 10 4. Applied Biosystems. 2006. Applied Biosystems 7500 and 7500 Fast Real-Time PCR Systems: A Real Fast and Real Versatile Approach to Real-Time PCR.
5. Armstrong TK, Anchordoquy TJ. 2004. Immobilization of nonviral vectors during the freezing step of lyophilization. *J. Pharm. Sci.* 93: 2698-2709.
6. Arya SC. 2001. Stabilization of vaccines: to be or not to be. *Vaccine* 19: 595-597.
- 15 7. Ausar SF, Rexroad J, Frolov VG, Look JL, Konar N, Middaugh CR. 2005. Analysis of the thermal and pH stability of human respiratory syncytial virus. *Mol. Pharm.* 2: 491-499.
8. Ausar SF, Foubert TR, Hudson MH, Vedvick TS, Middaugh CR. 2006. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus like particles: effect of pH and temperature. *J. Biol. Chem.* 281: 19478-19488.
9. Brandau DT, Jones LS, Wiethoff CM, Rexroad J, Middaugh CR. 2003. Thermal stability of vaccines. *J. Pharm. Sci.* 92: 218-231.
- 20 10. Breen ED, Curley JG, Overcashier DE, Hsu CC, Shire SJ. 2001. Effect of moisture on the stability of a lyophilized humanized monoclonal antibody formulation. *Pharm. Res.* 18: 1345-1353.
11. Carpenter JF, Pikal MJ, Chang BS, Randolph TW. 1997. Rational design of stable lyophilized protein formulations: some practical advice. *Pharm. Res.* 14: 969-975.
- 25 12. Carpenter JF, Chang BS, Garzon-Rodriguez W, Randolph TW. 2002. Rational design of stable lyophilized protein formulations: theory and practice. In Carpenter JF, Manning MC, editors. *Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 109-133.
13. Chang BS, Randall CS. 1992. Use of subambient thermal analysis to optimize protein lyophilization. *Cryobiology* 29: 632-656.
- 30 14. Chang BS, Kendrick BS, Carpenter JF. 1996. Surface-induced denaturation of proteins during freezing and its inhibition by surfactants. *J. Pharm. Sci.* 85: 1325-1330.
15. Chang LL, Shepherd D, Sun J, Tang XC, Pikal MJ. 2005. Effect of sorbitol and residual moisture on the stability of lyophilized antibodies: implications for the mechanism of protein stabilization in the solid state. *J. Pharm. Sci.* 94: 1445-1454.
- 35 16. Cicerone MT, Tellington A, Trost L, Sokolov A. 2003. Substantially improved stability of biological agents in dried form: the role of glassy dynamics in preservation of biopharmaceuticals. *BioProc. Intl.* 1: 36-47.
17. Cicerone MT, Soles CL. 2004. Fast dynamics and stabilization of proteins: binary glasses of trehalose and glycerol. *Biophys. J.* 86: 2836-3845.
- 40 18. DePaz RA, Dale DA, Barnett CC, Carpenter JF, Gaertner AL, Randolph TW. 2002. Effects of drying methods and additives on the structure, function, and storage stability of subtilisin: role of protein conformation and molecular mobility. *Enzyme Microb. Technol.* 31: 765-774.
19. Garzon-Rodriguez W, Koval RL, Chongprasert S, Krishnan S, Randolph TW, Warne NW, Carpenter JF. 2004. Optimizing storage stability of lyophilized recombinant human interleukin-11 with disaccharide/hydroxyethyl starch mixtures. *J. Pharm. Sci.* 93: 684-696.
- 45 20. Hancock BC, Zografi G. 1994. The relationship between the glass transition temperature and the water content of amorphous pharmaceutical solids. *Pharm. Res.* 11: 471-477.
21. Hancock BC, Zografi G. 1997. Characteristics and significance of the amorphous state in pharmaceutical systems. *J. Pharm. Sci.* 86: 1-12.

22. Kreilgaard L, Jones LS, Randolph TW, Frokjaer S, Flink JM, Manning MC, Carpenter JF. 1998a. Effect of Tween 20 on freeze-thawing- and agitation-induced aggregation of recombinant human factor XIII. *J. Pharm. Sci.* 87: 1597-1603.
- 5 23. Kreilgaard L, Frokjaer S, Flink JM, Randolph TW, Carpenter JF. 1998b. Effects of additives on the stability of recombinant human factor XIII during freeze-drying and storage in the dried solid. *Arch. Biochem. Biophys.* 360: 121-134.
24. Kreilgaard L, Frokjaer S, Flink JM, Randolph TW, Carpenter JF. 1999. Effects of additives on the stability of Humicola lanuginosa lipase during freeze-drying and storage in the dried solid. *J. Pharm. Sci.* 88: 281-290.
- 10 25. Lopez-Diez EC, Bone S. 2000. An investigation of the water-binding properties of protein + sugar systems. *Phys. Med. Biol.* 45: 3577-3588.
26. Miller DP, Anderson RE, de Pablo JJ. 1998. Stabilization of lactate dehydrogenase following freeze-thawing and vacuum-drying in the presence of trehalose and borate. *Pharm. Res.* 15: 1215-1221.
- 15 27. Molina MC, Allison SD, Anchordoquy TJ. 2001. Maintenance of nonviral vector particle size during the freezing step of the lyophilization process is insufficient for preservation of activity: insight from other structural indicators. *J. Pharm. Sci.* 90: 1445-1455.
28. Molina MC, Armstrong TK, Zhang Y, Patel MM, Lentz YK, Anchordoquy TJ. 2004. The stability of lyophilized lipid/DNA complexes during prolonged storage. *J Pharm. Sci.* 93: 2259-2273.
29. Oksanen CA, Zografi G. 1993. Molecular mobility in mixtures of adsorbed water and solid poly(vinylpyrrolidone). *Pharm. Res.* 10: 791-799.
- 20 30. Peek LJ, Brandau DT, Jones LS, Joshi SB, Middaugh CR. 2006. A systematic approach to stabilizing EBA-175 RII-NG for use as a malaria vaccine. *Vaccine* 24: 5839-5851.
31. Pikal MJ. 1999. Mechanisms of protein stabilization during freeze-drying and storage: the relative importance of thermodynamic stabilization and glassy state relaxation dynamics. In Rey L, May JC, editors. *Freeze-Drying/Lyophilization of Pharmaceutical and Biological Products*, New York: Marcel Dekker pp 161-198.
- 25 32. Prestrelski SJ, Tedeschi N, Arakawa T, Carpenter JF. 1993. Dehydration-induced conformational changes in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* 65: 661-671.
33. Prince AM, Stephan W, Kotitschke R, Brotman B. 1983. Inactivation of hepatitis B and non-A, non-B viruses by combined use of Tween 80, beta-propiolactone, and ultraviolet irradiation. *Thromb. Haemost.* 50: 534-536.
- 30 34. Pushko P, Parker M, Ludwig GV, Davis NL, Johnston RE, Smith JF. 1997. Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: Expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology* 239: 389-401.
- 35 35. Randolph TW. 1997. Phase separation of excipients during lyophilization: effects on protein stability. *J. Pharm. Sci.* 86: 1198-1203.
36. Randolph TW, Jones LS. 2002. Surfactant-protein interactions. In Carpenter JF, Manning MC, editors. *Rational Design of Stable Protein Formulations: Theory and Practice*, New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers, pp 159-175.
37. Rayner JO, Dryga SD, Kamrud KI. 2002. Alphavirus vectors and vaccination. *Rev. Med. Virol.* 12: 279-296.
- 40 38. Reap, E.A., J. Morris, S.A. Dryga, M. Maughan, T. Talarico, R.E. Esch, S. Negri, B. Burnett, A. Graham, R.A. Olmsted, J.D. Chulay. (2007) Development and preclinical evaluation of an alphavirus replicon particle vaccine for cytomegalovirus. *Vaccine* 25(42), 7441-9.
39. Rexroad J, Wiethoff CM, Jones LS, Middaugh CR. 2002. Lyophilization and the thermostability of vaccines. *Cell Preserv. Technol.* 1: 91-104.
40. Rexroad J, Wiethoff CM, Green AP, Kierstead TD, Scott MO, Middaugh CR. 2003. Structural stability of adenovirus type 5. *J. Pharm. Sci.* 92: 665-678.
- 45 41. Rexroad J, Evans RK, Middaugh CR. 2006. Effect of pH and ionic strength on the physical stability of adenovirus type 5. *J. Pharm. Sci.* 95: 237-247.
42. Ryan C, Ivanova L, Schlesinger MJ. 1998. Effects of site-directed mutations of transmembrane cysteines in Sindbis virus E1 and E2 glycoproteins on palmitoylation and virus replication. *Virology* 249: 62-67.
43. Smith JF, Brown DT. 1977. Envelopment of Sindbis virus: synthesis and organization of proteins in cells infected

with wild type and maturation-defective mutants. J. Virol. 22: 662-678.

44. Strauss JH, Strauss EG. 1994. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. Microbiol. Rev. 58: 491-562.

5 45. Talarico, T., Maughan, M., Pancorbo, B., Ruiz, J., and A. Graham. Development and Manufacture of Alphavaccines. BioProcessing Journal • 2006. Fall:8-14.

46. Tang XC, Pikal MJ. 2004. Design of freeze-drying processes for pharmaceuticals: practical advice. Pharm. Res. 21: 191-200.

47. Timasheff SN. 1998. Control of protein stability and reactions by weakly interacting cosolvents: the simplicity of the complicated. Adv. Prot. Chem. 51: 355-432.

10 48. Volkin DB, Burke CJ, Marfia KE, Oswald CB, Wolanski B, Middaugh CR. 1997. Size and conformational stability of the hepatitis A virus used to prepare VAQTA, a highly purified inactivated vaccine. J. Pharm. Sci. 86: 666-673.

49. Yoshioka S, Aso Y, Kojima S. 2000. Temperature dependence of biomolecular reactions associated with molecular mobility in lyophilized formulations. Pharm. Res. 17: 925-929.

50. Zaffran M. 1996. Vaccine transport and storage: environmental challenges. Dev. Biol. Stand. 87: 9-17.

15 **Tabla 1.** Composición de las doce formulaciones examinadas en este estudio

ID	Sal		Disacárido		Agente diluyente			Tensioactivo	
	Citrato de sodio	Sulfato de sodio	Sacarosa (%)	Dextrán (%)	HSA (%)	HES (%)	Manitol (%)	Tween 80 (%)	
B1	50 mM	100 mM							
B2									
S	100 mM	4							
D	100 mM		1						
A	100 mM			1					
H	100 mM				1				
T	100 mM						0.001		
SD	100 mM	4	1						
SA	100 mM	4		1					
SH	100 mM	4			1				
ST	100 mM	4					0.001		
M	100 mM					4			

B, tampón y sal solamente; S, sacarosa; D, dextrán; A, HSA; H, HES; T, Tween; M, manitol. % se refiere a p/v. El tampón fue tris 10 mM, pH 7.4. Todas las formulaciones se prepararon con Agua para Irrigación (WFI).

La formulación SA forma parte de la presente invención.

**Tabla 2.** Temperatura de transición vítrea de la fase amorfa concentrada al máximo por congelación ( $T_g'$ ) para los diferentes tampones de formulación según se determina por DSC.

	$T_g'$ de la formulación (°C)	$T_g'$ sin sal (°C)
B1	-44	nd (B1 y B2)
B2	nd	
S	-36	-35
D	nd	nd
A	nd	nd
H	nd	nd

	T <sub>g</sub> ' de la formulación (°C)	T <sub>g</sub> ' sin sal (°C)
T	nd	nd
SD	-31	-31
SA	-31	-31
SH	-34	-35
ST	-35	-36
M	nd	Nd

nd: no se detectó transición vítrea

La formulación SA forma parte de la presente invención.

**Tabla 3.** Propiedades físicas de las tortas secadas por congelación

	% de humedad <sup>a</sup>	T <sub>g</sub> ' (°C) <sup>b</sup>
B1	> 10%	23
B2	1.444 ± 0.004	nd <sup>c</sup>
S	2.2 ± 0.2	35
D	4.3 ± 0.6	nd <sup>c</sup>
A	4.2 ± 0.3	nd <sup>c</sup>
H	6 ± 1	nd <sup>c</sup>
T	1.8 ± 0.2	nd <sup>c</sup>
SD	2.7 ± 0.7	56
SA	2.8 ± 0.6	40
SH	2.5 ± 0.6	45
ST	2.6 ± 0.3	33
M	1.9 ± 0.2	nd <sup>c</sup>

<sup>a</sup> humedad % determinada por la titulación coulométrica Karl Fischer para n = 3 viales con placebo (± desviación estándar) después de la liofilización

<sup>b</sup>Temperatura de transición vítrea del sólido deseado.

<sup>c</sup>nd: sin transición vítrea detectada

La formulación SA forma parte de la presente invención.

**Tabla 4.** Pérdidas en el título de infectividad para GFP VRP durante el almacenamiento

	Pérdida log después de 14 días a 37°C
ST	0,6 ± 0,2
SH	2,2 ± 0,2
SA	2,3 ± 0,2
S	2,5 ± 0,2
SD	2,7 ± 0,2
D	3,2 ± 0,3
H	3,7 ± 0,2
A	4,9 ± 0,2
B1	sin título > 3 días

Pérdida log después de 14 días a 37°C	
M	sin título > 3 días
B2	sin título > 1 día
T	sin título > 1 día

La formulación de SA forma parte de la presente invención.

**Tabla 5.** Pérdidas en las cantidades del genoma (GQ) para GFP VRP

	Pérdida log después del almacenamiento/filtración <sup>a</sup>
B1	0.3 <sup>b</sup>
B2	0.4 <sup>b</sup>
S	0.7 <sup>b</sup>
D	0.8 <sup>b</sup>
A	0.0
H	1.0°
T	0.6°
SD	0.4 <sup>b</sup>
SA	0.2
SH	0.8 <sup>b</sup>
ST	0.2
M	0.5°

<sup>a</sup> Valores GQ medidos después de la filtración de la muestra a los 14 días, 37°C en comparación con el valor antes de la filtración.

<sup>b</sup> La disminución es significativa ya que es al menos la de la precisión del ensayo (-0,3 log).

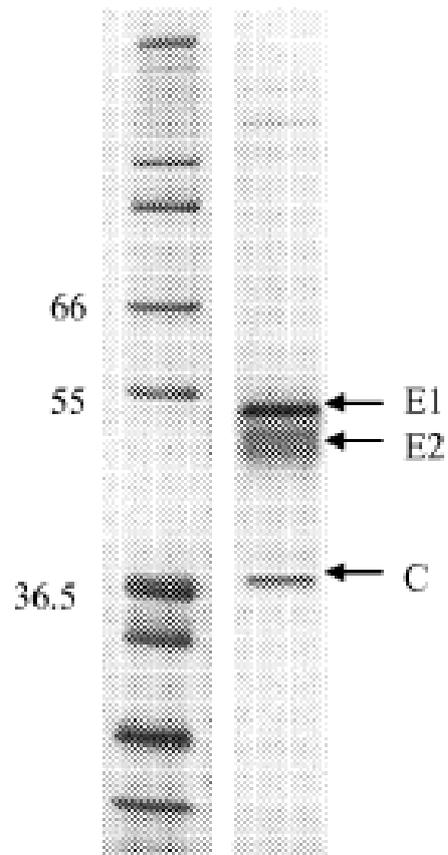
La Formulación SA forma parte de la presente invención.

**Tabla 6.** Eliminación de NaCl de las preparaciones de VRP

Proceso de cromatografía	Título (IU/ml)	% de recuperación	Proteína (ug/mL)	ADN (ng/mL)	Proteína (ug/1 E8 IU)	ADN (ng/1 E8 IU)
Elución con NaCl	3.30E + 09	69.5	12.4	16.5	0.4	0.5
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> elución tipo 1	4.10E + 08	42.4	11.9	11.9	2.9	2.9
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> elución tipo 2	2.50E + 09	47.1	9.9	15.0	0.4	0.6

**REIVINDICACIONES**

1. Un método para preparar una composición seca con estabilidad de rehidratación y almacenamiento, que comprende las etapas de:
- (a) preparar una solución o dispersión acuosa que comprende
- 5 el virus de la encefalitis equina venezolana (VEE) o partículas de replicón del mismo;
- una sal, en donde la sal es sulfato de sodio a una fuerza iónica de 50 mM a 400 mM; o
- en donde la sal es cloruro de sodio a una fuerza iónica de 100 mM a 500 mM; un tensioactivo, en donde el tensioactivo es albúmina de suero humano;
- sacarosa; y,
- 10 opcionalmente, un plastificante que comprende glicerol y/o un agente diluyente, en donde el agente diluyente es hidroxietil almidón, dextrano, manitol, glicina, Ficoll o polivinilpirrolidona;
- mantener la solución o dispersión a un pH de 7 a 9 antes del secado; y
- tamponar la solución o dispersión con ácido bórico y una sal de tetraborato farmacéuticamente aceptable antes del secado y
- 15 (b) secar la dispersión acuosa para obtener una composición en donde el VEE o partículas del replicón del mismo se dispersan en una matriz amorfa vítrea que comprende el tensioactivo y sacarosa y, opcionalmente, el plastificante y/o el agente diluyente.
2. El método de la reivindicación 1, en donde la solución o dispersión acuosa además comprende el plastificante.
3. El método de la reivindicación 1 o 2, en donde la solución o dispersión acuosa además comprende el agente diluyente.
- 20 4. El método de la reivindicación 1, en donde la albúmina de suero humano se produce de manera recombinante.
5. El método de la reivindicación 1, en donde el contenido de humedad residual de la composición seca es de 0,5% a 10%;
- en donde, de manera opcional, el contenido de humedad residual es de 2 a 7%; y
- 25 en donde, además, de manera opcional, el contenido de humedad residual es de 3 a 5%.
6. El método de la reivindicación 1, en donde la composición comprende el plastificante y la cantidad de glicerol en la solución o dispersión acuosa es de 0,05% a 2%.
7. El método de la reivindicación 1, en donde la composición comprende el plastificante y el plastificante además comprende polipropilenglicol.
- 30 8. El método de la reivindicación 1, en donde la solución o dispersión acuosa comprende una concentración 10 mM de fosfato de sodio, 4% de sacarosa, 0,1% de albúmina de suero humano, una concentración 100 mM de sulfato de sodio y 0,25% de glicerol.
9. Una composición seca que comprende
- (1) virus de encefalitis equina venezolana (VEE) o partículas de replicón de los mismos,
- 35 (2) una sal, en la que la sal se selecciona de sulfato de sodio y cloruro de sodio,
- (3) un tensioactivo, en donde el tensioactivo es albúmina de suero humano, y
- (4) sacarosa
- y, opcionalmente, (5) un plastificante que comprende glicerol y/o un agente diluyente, en donde el agente diluyente es hidroxietil almidón, dextrano, manitol, glicina, Ficoll o polivinilpirrolidona; y en donde la composición seca puede
- 40 obtenerse mediante el método de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8.



**Figura 1**

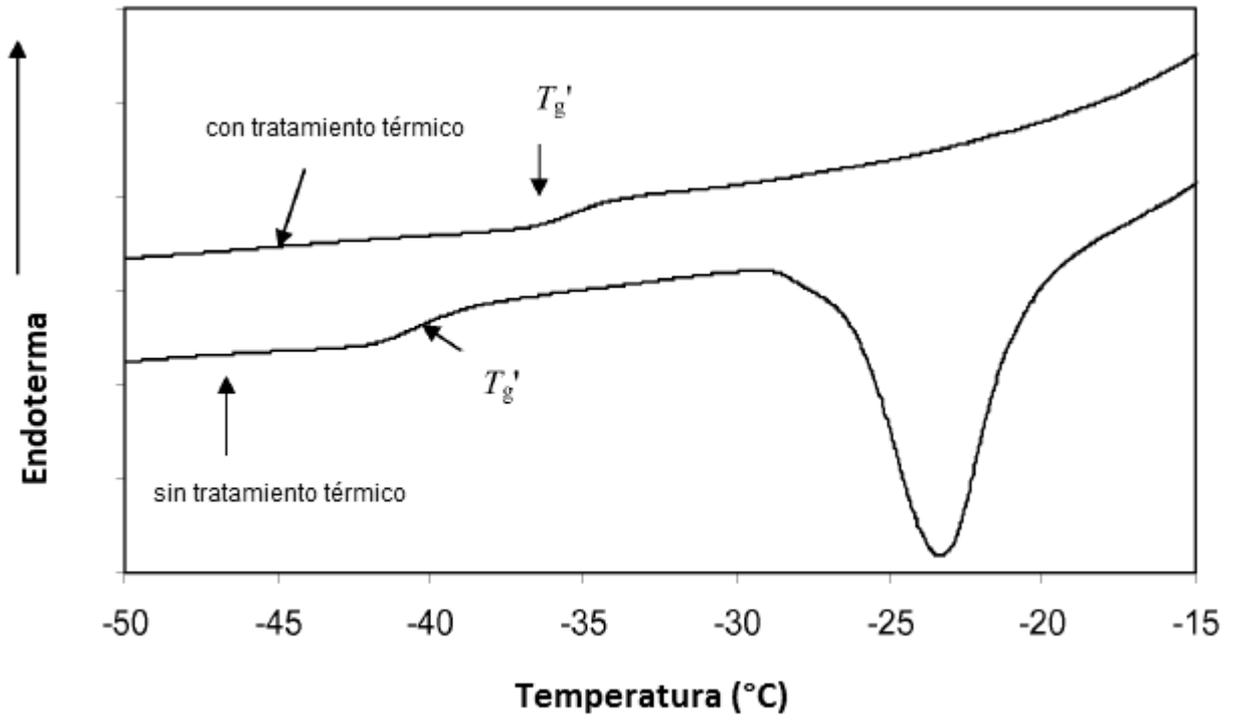


Figura 2

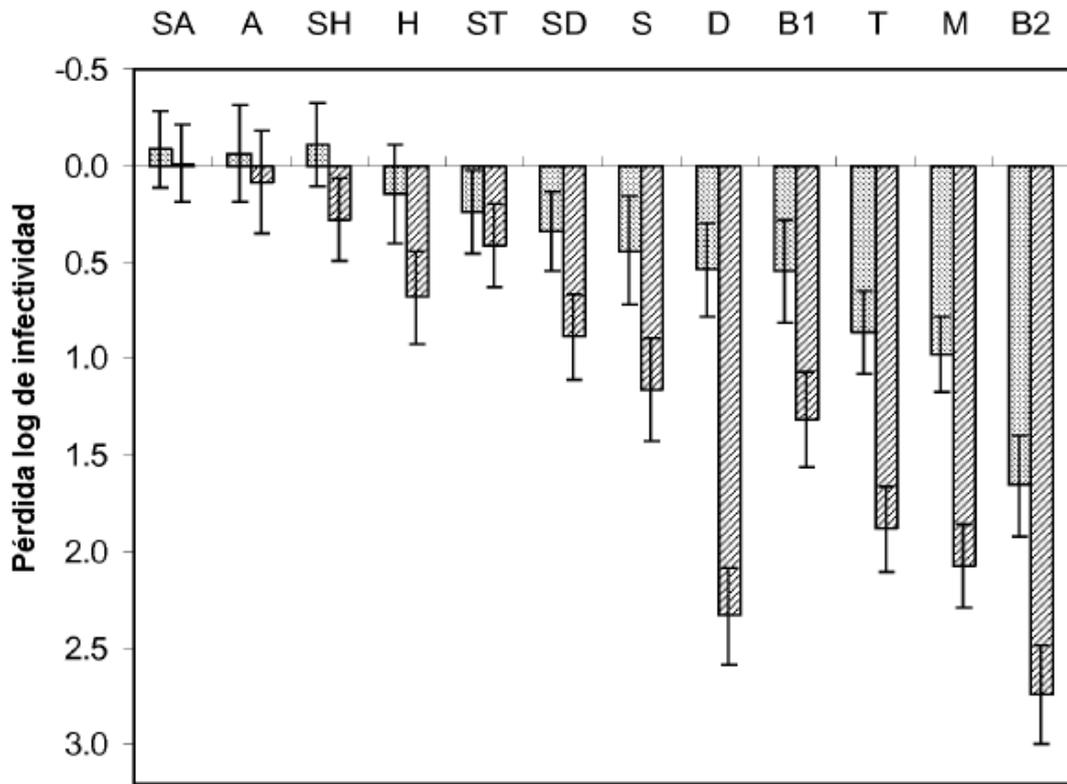


Figura 3

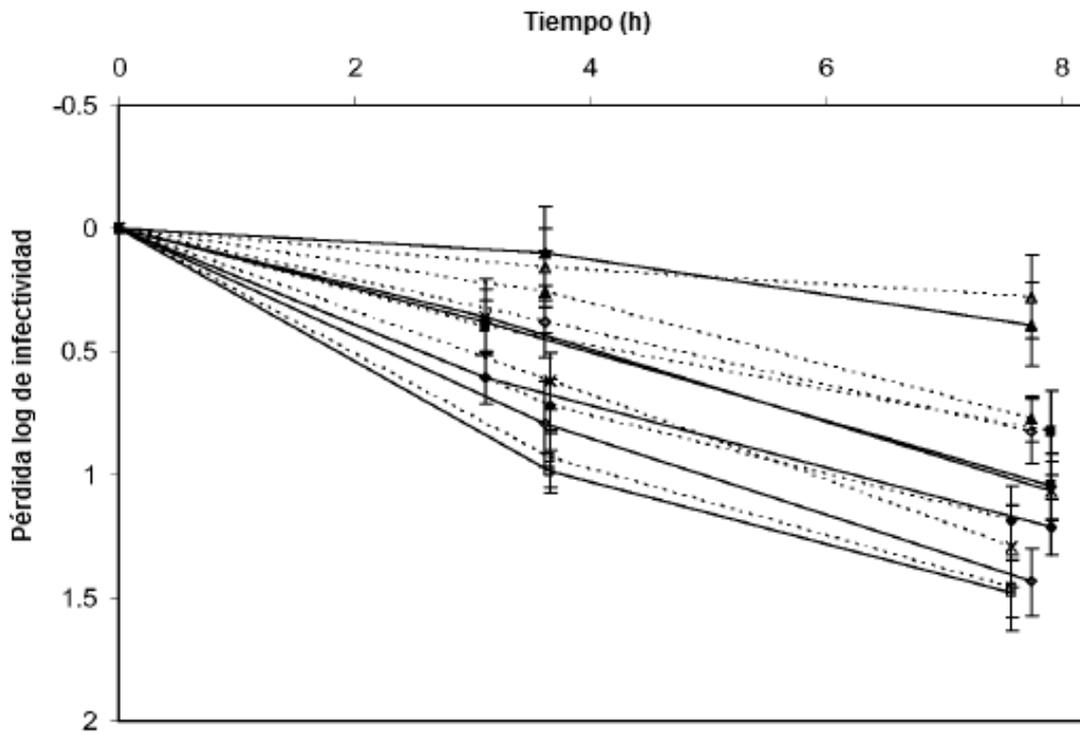


Figura 4A

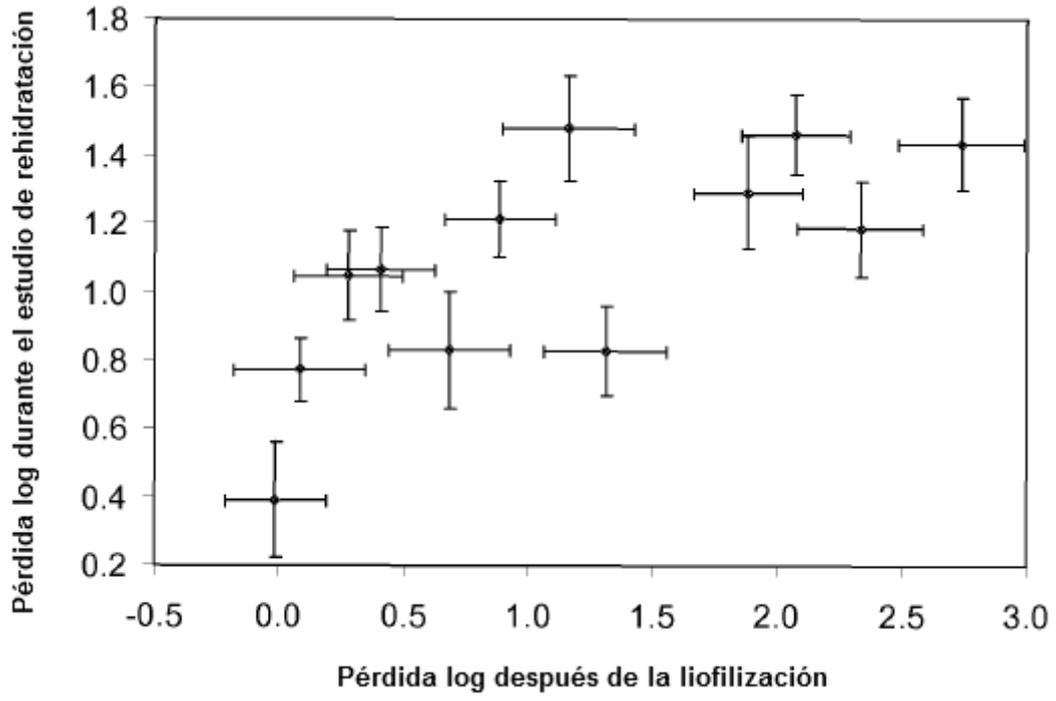


Figura 4B

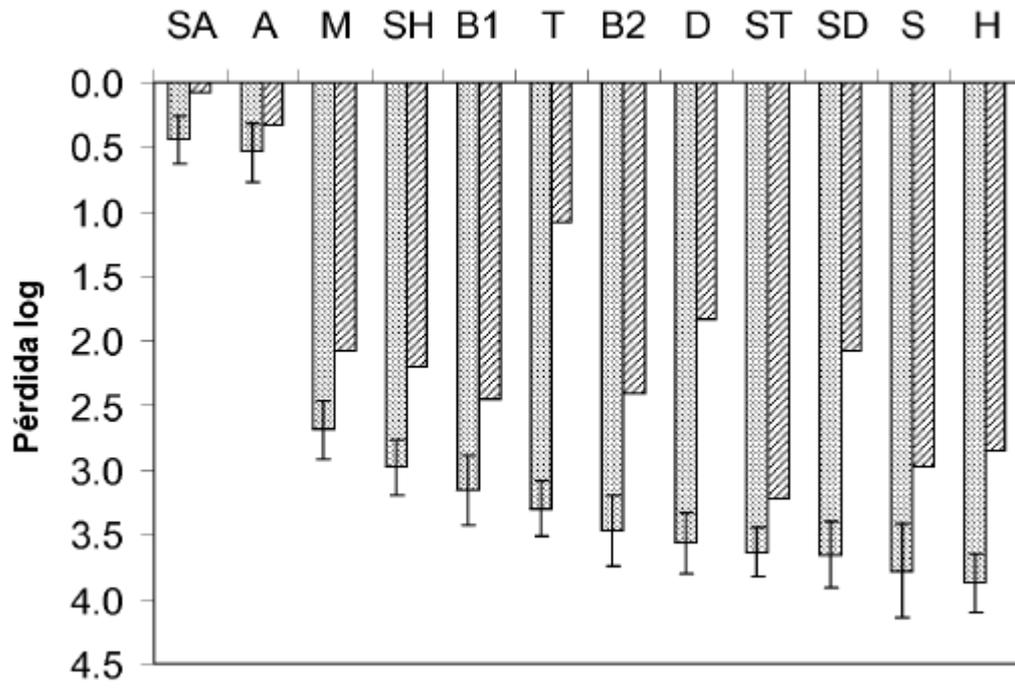


Figura 5

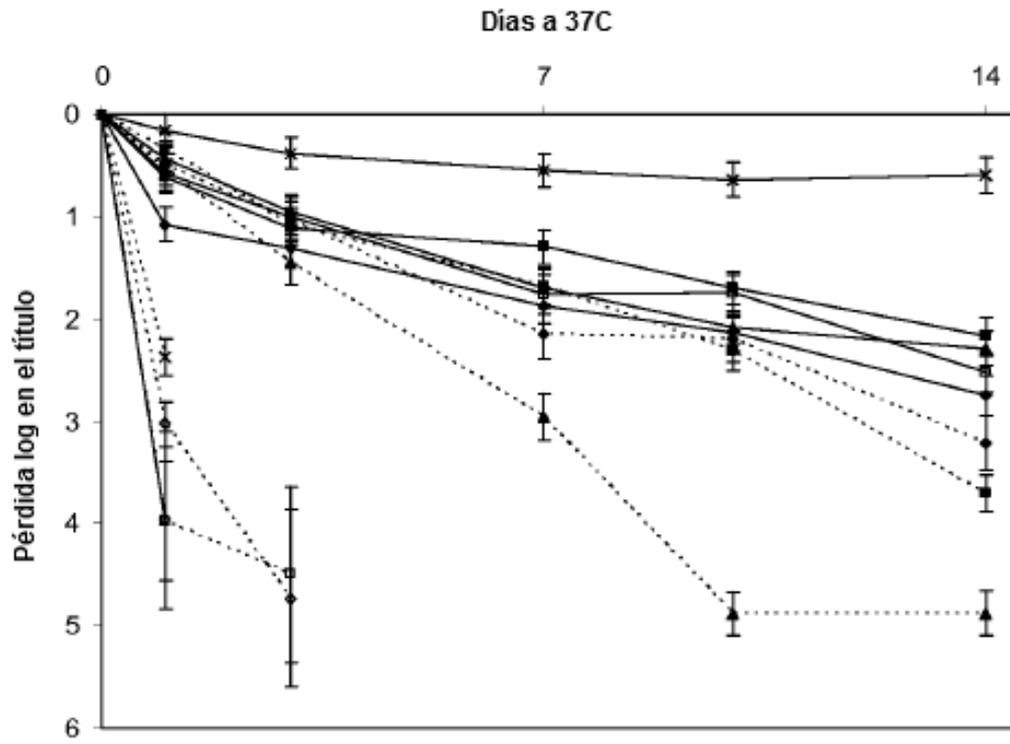


Figura 6

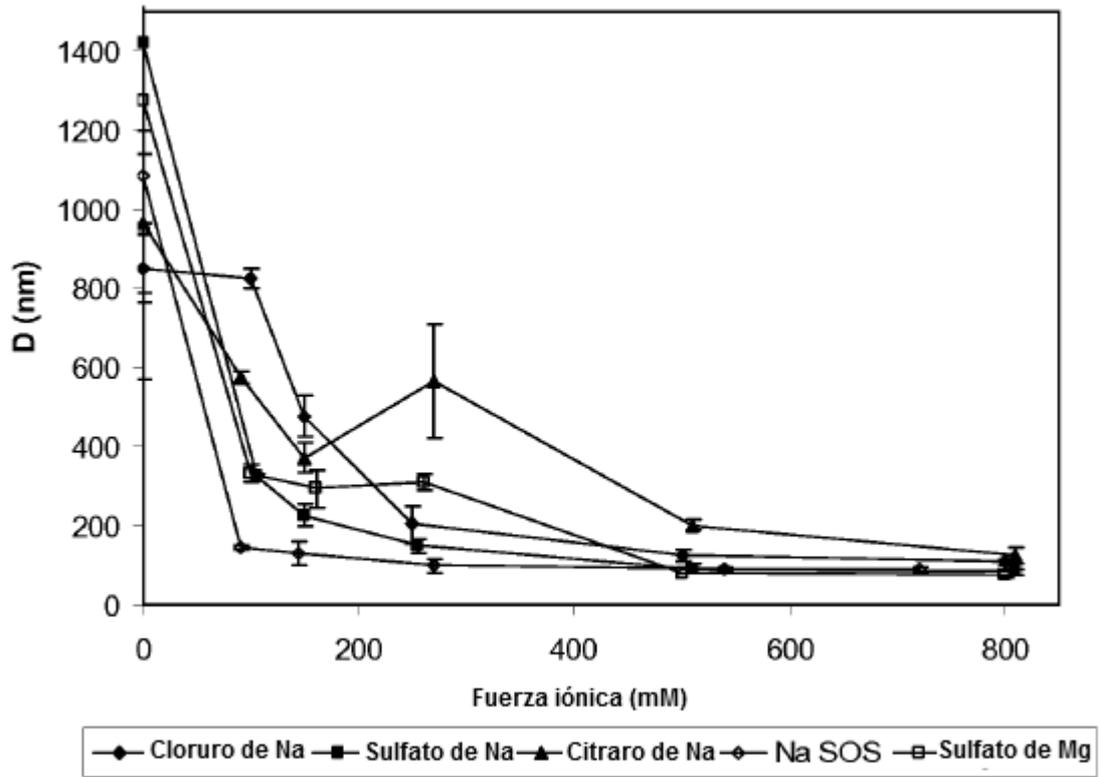


Figura 7

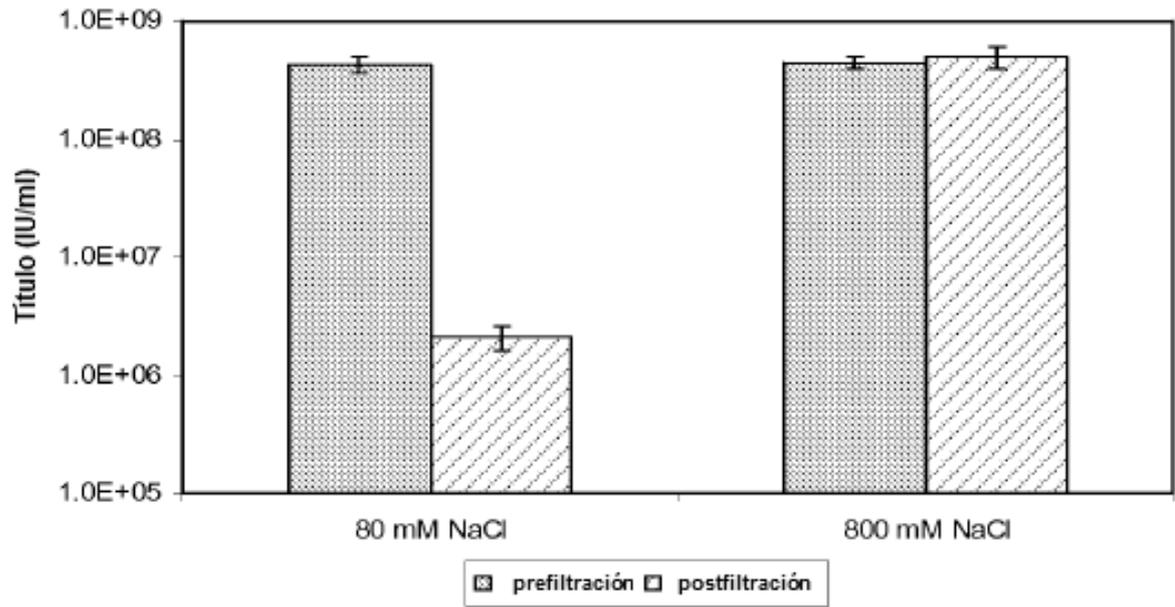


Figura 8

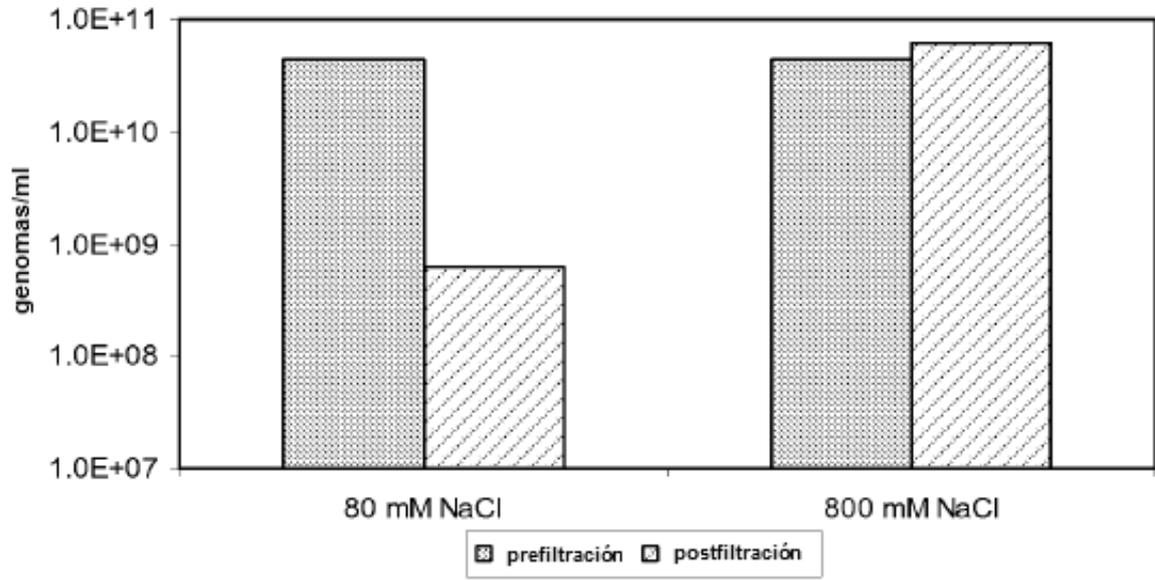


Figura 9

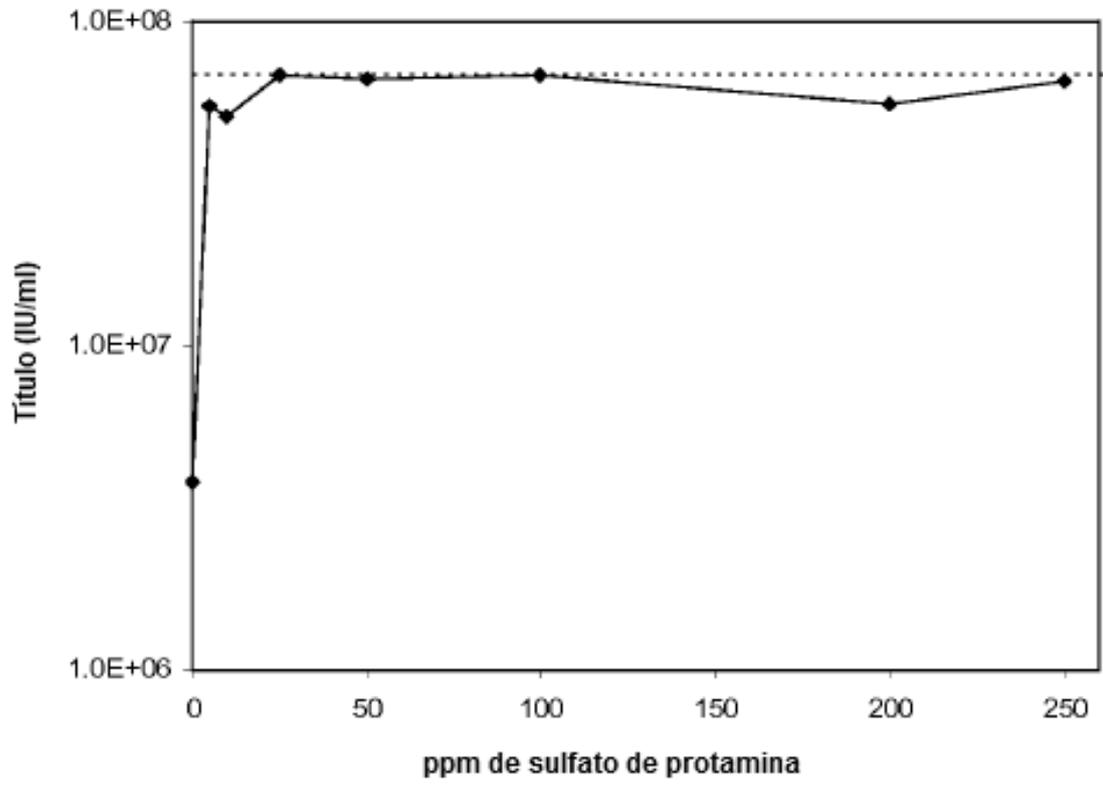


Figura 10A

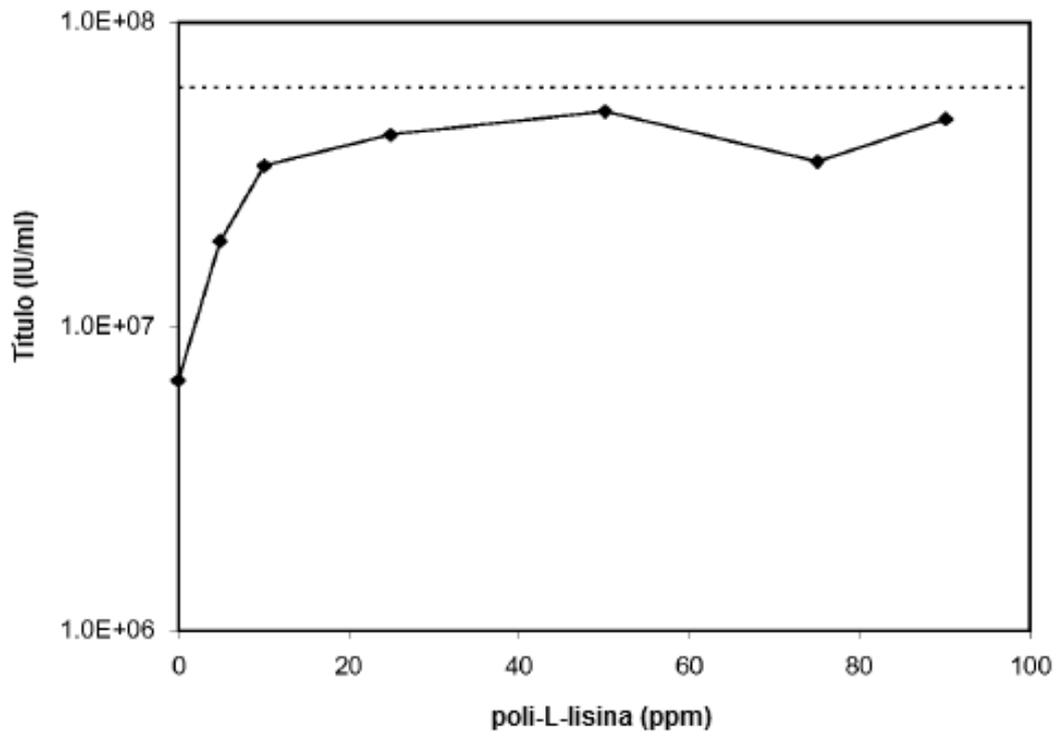


Figura 10B

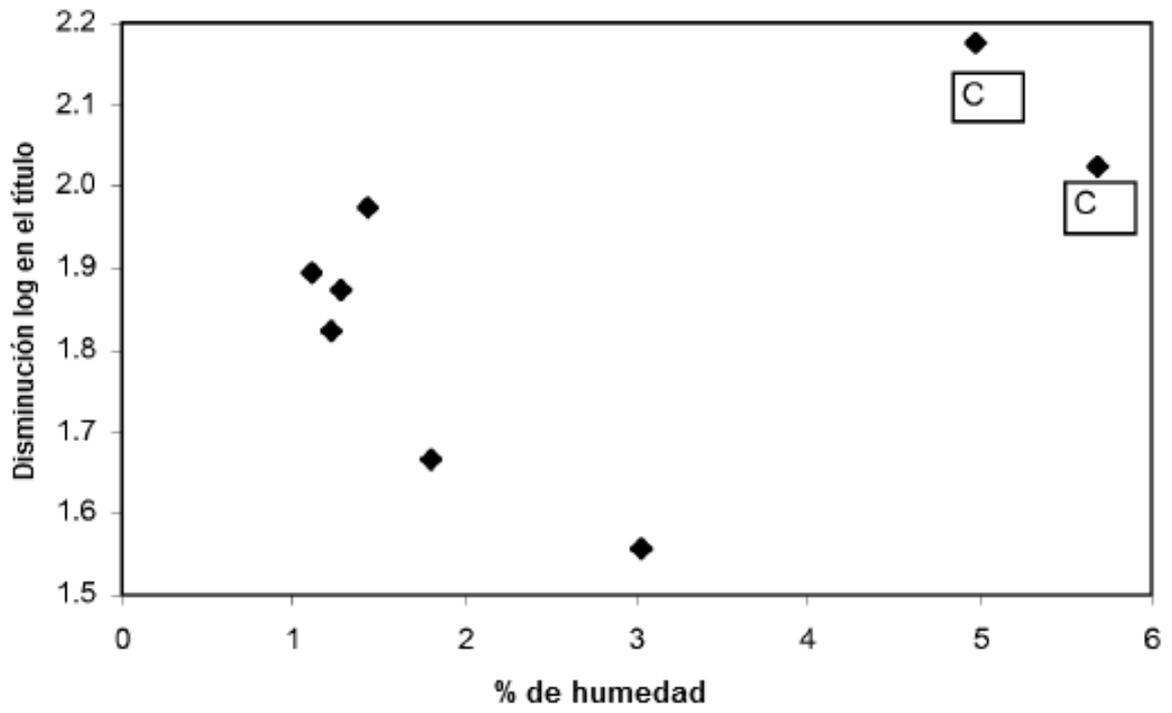


Figura 11

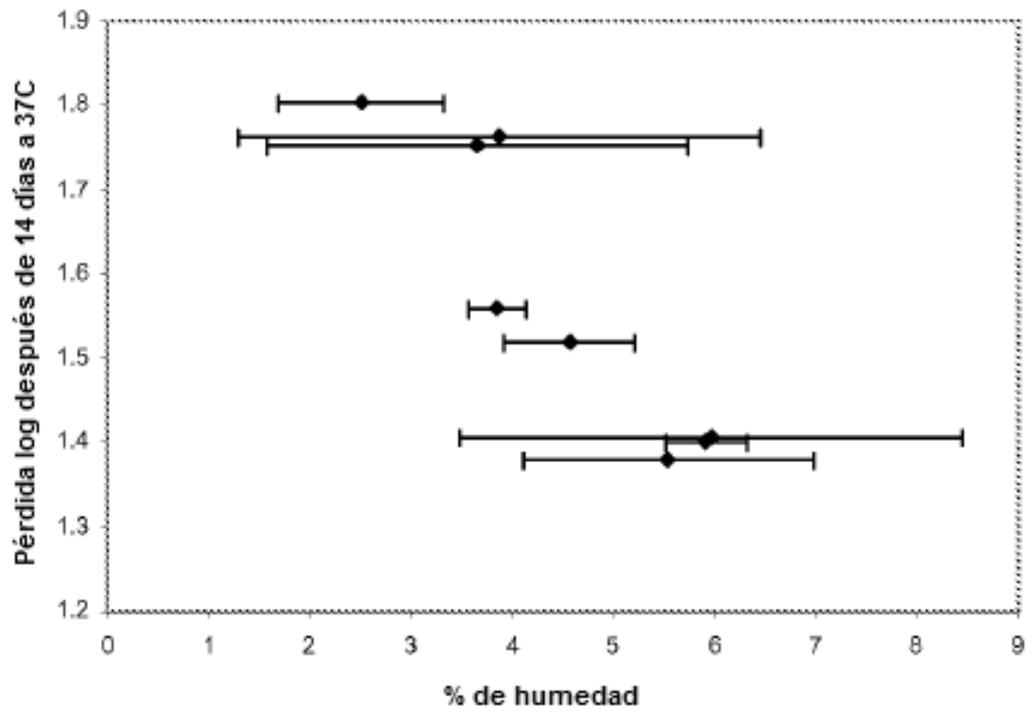


Figura 12

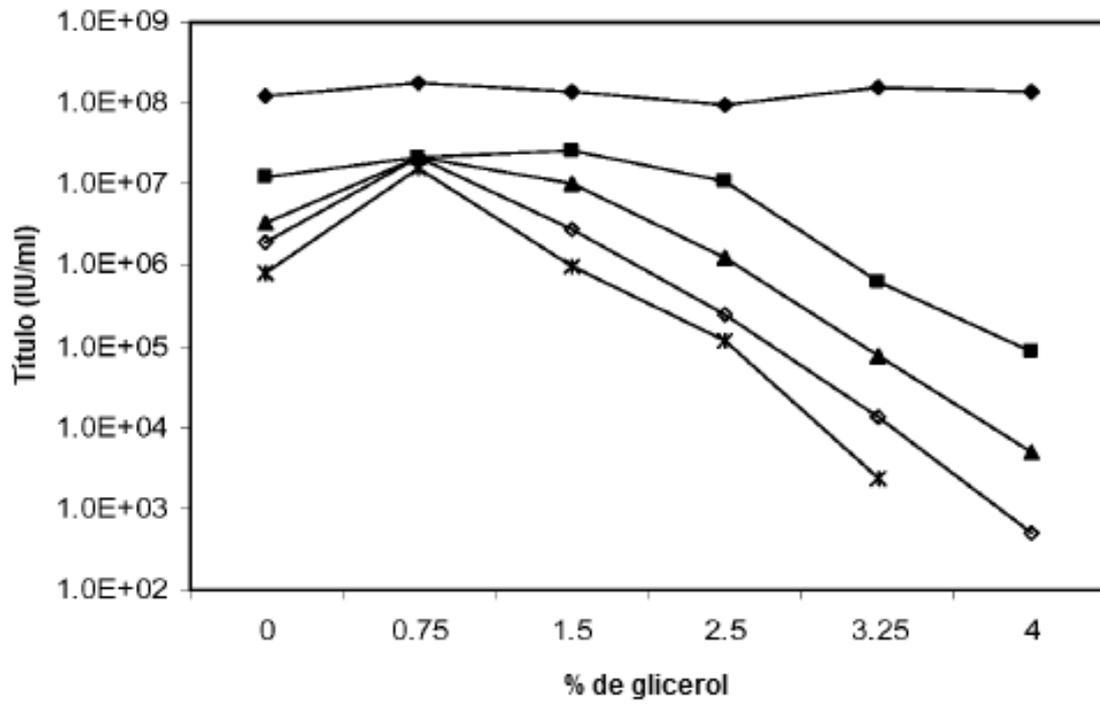


Figura 13

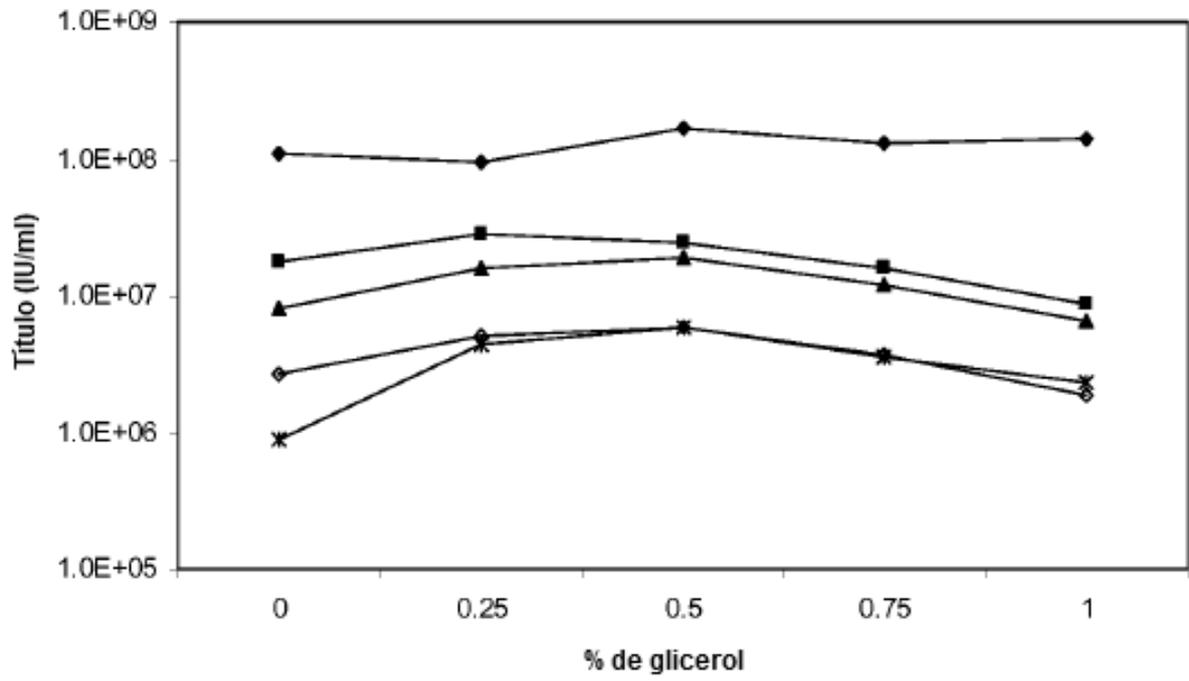


Figura 14

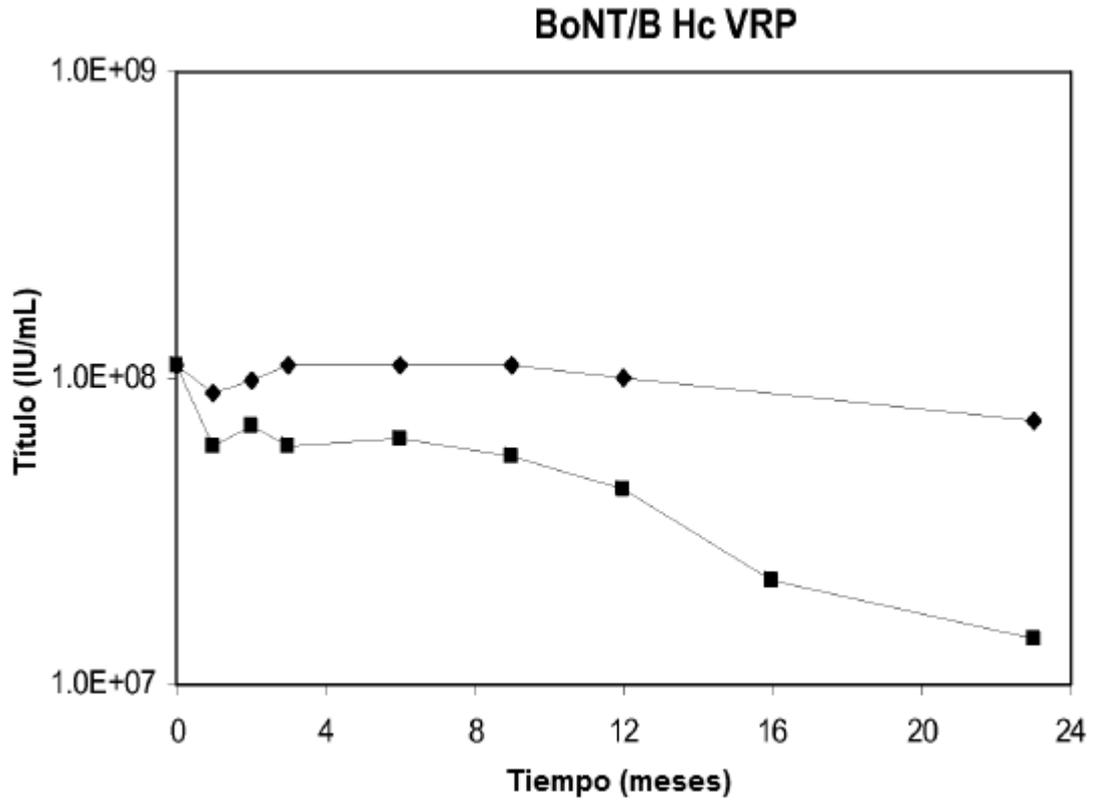


Figura 15

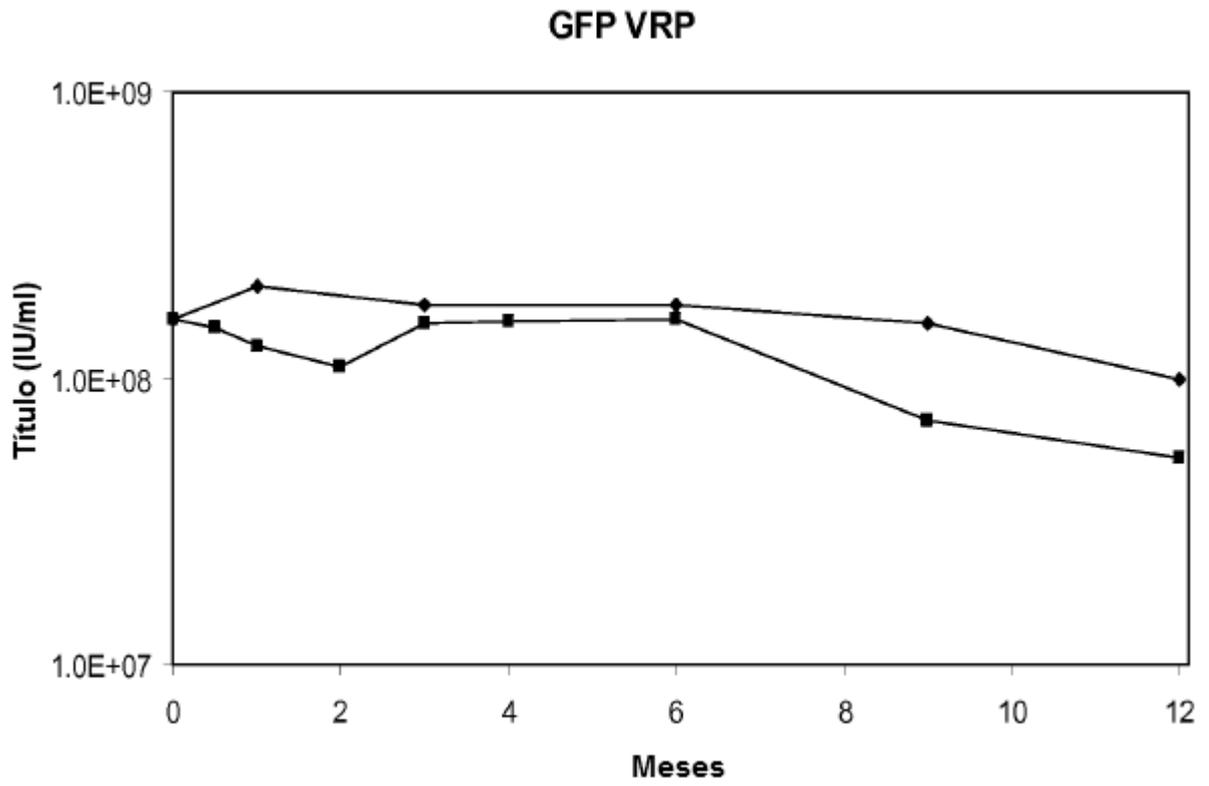
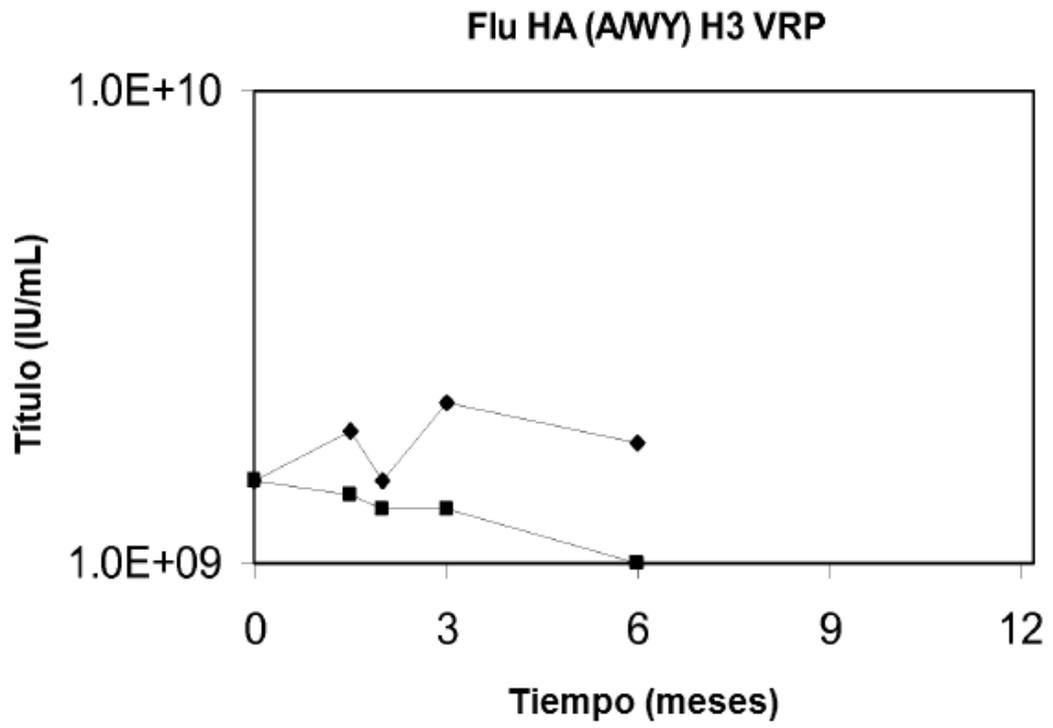


Figura 16A





**Figura 16C**

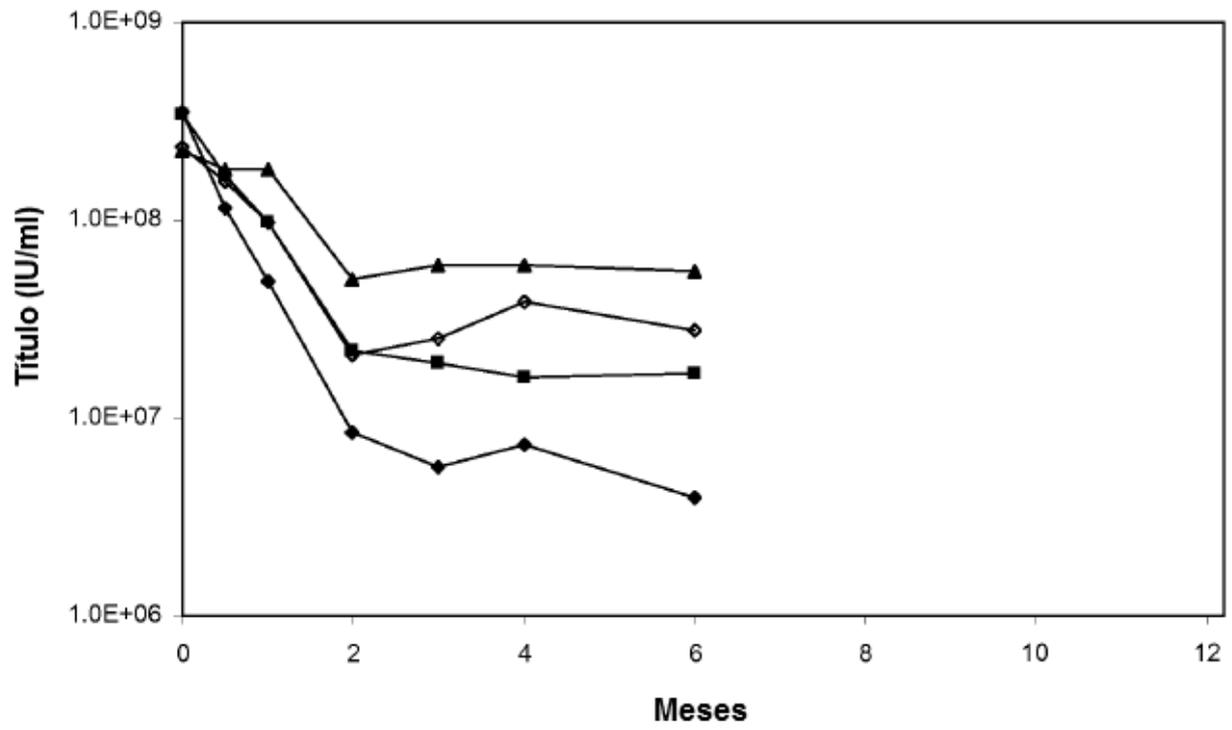


Figura 17

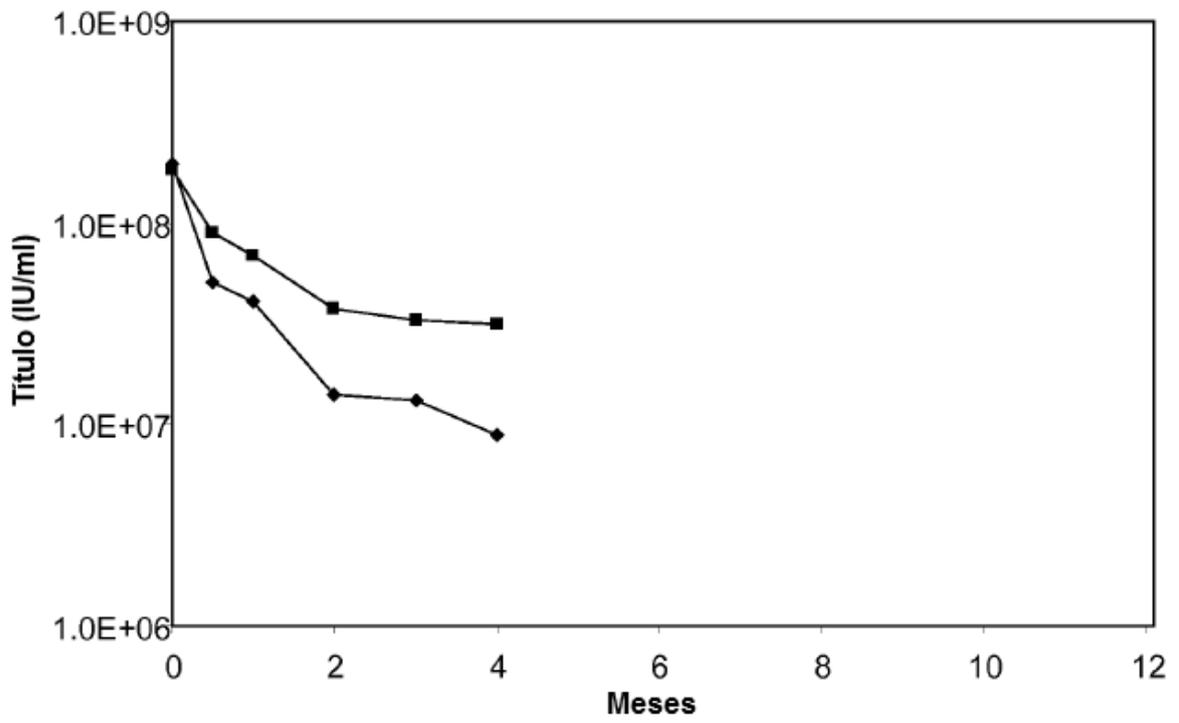


Figura 18