

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 803 578**

51 Int. Cl.:

C12N 7/04 (2006.01)

C12N 7/06 (2006.01)

A61K 39/13 (2006.01)

A61K 39/39 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **06.10.2015 PCT/IN2015/000376**

87 Fecha y número de publicación internacional: **28.04.2016 WO16063291**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **06.10.2015 E 15831237 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **01.04.2020 EP 3204494**

54 Título: **Métodos mejorados para la inactivación del enterovirus, adsorción de adjuvante y composiciones de vacuna de dosis reducida obtenidas de los mismos**

30 Prioridad:

07.10.2014 IN 3180MU2014

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

28.01.2021

73 Titular/es:

**SERUM INSTITUTE OF INDIA PRIVATE LIMITED
(100.0%)**

**212/2 Off Soli Poonawalla Road, Hadapsar
Pune 411 028, Maharashtra, IN**

72 Inventor/es:

DHERE, RAJEEV MHALASAKANT;

PISAL, SAMBHAJI SHANKAR;

ZADE, JAGDISH KAMALAJI y

SABALE, RAJENDRA NARAYAN

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 803 578 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos mejorados para la inactivación del enterovirus, adsorción de adyuvante y composiciones de vacuna de dosis reducida obtenidas de los mismos

5 Antecedentes de la Invención

10 La prevalencia del virus de la poliomielitis se ha reducido en gran medida con el uso de la vacuna oral contra la poliomielitis (OPV, por su versión en inglés), basada en cepas de polio Sabin atenuadas en vivo. Sin embargo, la OPV tiene limitaciones para la era posterior a la erradicación. Por lo tanto, el desarrollo de una vacuna Sabin IPV (IPV, por su versión en inglés) juega un papel importante en la estrategia de erradicación de la poliomielitis de la OMS. El uso de cepas Sabin atenuadas en lugar de cepas de polio Salk de tipo salvaje proporcionará seguridad adicional durante la producción de la vacuna. Además, para evitar la aparición de poliovirus derivados de vacuna circulante (cVDPV, por sus siglas en inglés) el uso de la OPV debería discontinuarse siguiendo la erradicación de la poliomielitis y reemplazarse por la IPV. Estos cVDPV son transmisibles y pueden convertirse en neurovirulentos (similares a los poliovirus salvajes), lo que resulta en una poliomielitis paralítica asociada a la vacuna. Tales cepas pueden potencialmente volver a sembrar el mundo con poliovirus y anular los logros de la erradicación.

20 La IPV se administra mediante inyección intramuscular (IM) o subcutánea profunda (SC). Actualmente, la IPV está disponible como una formulación independiente no adyuvante, o en varias combinaciones, incluyendo DT-IPV (con toxoides de difteria y tétanos) y vacunas hexavalentes DTPHepB-Hib-IPV (adicionalmente con tos ferina, hepatitis B y Haemophilus influenzae b.) La dosis estándar actualmente aceptable de vacunas contra la poliomielitis contiene antígenos D como 40 unidades de poliovirus inactivado tipo 1 (Mahoney), 8 unidades de poliovirus inactivado tipo 2 (MEF-I) y 32 unidades de poliovirus inactivado tipo 3 (Saukett) (p. Ej. Infanrix-IPV™). Las preparaciones existentes de IPV autónomo no contienen adyuvante.

30 La mayoría de los expertos están de acuerdo en que el uso mundial de la IPV es preferible debido a su historial de protección y seguridad comprobadas. Sin embargo, en comparación con la OPV, el precio de costo para IPV es significativamente mayor. Esto se debe principalmente a los requisitos para: (i) más virus por dosis; (ii) procesamiento posterior adicional (es decir, concentración, purificación e inactivación), y las pruebas de control de calidad relacionadas (iii) pérdida de antígeno o mala recuperación posterior, y iv) contención. Hasta ahora, el desafío financiero ha sido un gran inconveniente para la innovación e implementación de IPV en países de bajos y medianos ingresos. Los costos de producción de sIPV se estiman actualmente equivalentes a los de IPV, que es aproximadamente 20 veces más costoso que OPV. La futura demanda mundial de IPV luego de la erradicación de los poliovirus podría aumentar del nivel actual de 80 millones de dosis a 450 millones de dosis por año. En consecuencia, es probable que se requieran enfoques para "estirar" los suministros de IPV.

40 Las formulaciones de vacunas eficaces de dosis reducidas que proporcionan protección contra la infección utilizando una dosis más baja de antígeno IPV son deseables en situaciones en las que el suministro de una vacuna convencional es insuficiente para satisfacer las necesidades globales o donde el costo de fabricación de la vacuna convencional impide que la vacuna se venda a un precio accesible para los países en desarrollo. También la exposición a dosis más bajas de IPV; en comparación con las formulaciones comercializadas existentes, podría ser más seguro. Por lo tanto, se deben evaluar varias estrategias para hacer que la IPV esté disponible a precios más accesibles.

45 En el caso de las vacunas contra la influenza pandémica, el uso de adyuvantes ha permitido reducir la dosis, aumentar la disponibilidad y reducir el costo de la vacuna. Por lo tanto, se ha especulado que una formulación de vacuna adyuvante de sIPV reduciría el costo y también aumentaría el número de dosis de sIPV disponibles en todo el mundo.

50 Grupos de investigación globalmente diferentes han estado evaluando el ahorro de dosis para las vacunas (vacunas contra la influenza en particular) mediante el empleo de varios adyuvantes, a saber, Alumbre, Emulsión, Agonistas de TLR (MPL, CpG, poli-IC, imiquimod), dmLT, 1,25-dihidroxitamina D3, CAF01, poli [di (carboxilatofenoxi) -fosfenceno] (PCPP) y partículas de replicón de encefalitis equina Venezolana (VEE). La mayoría de los tipos de adyuvantes en estudio han encontrado los siguientes obstáculos i) Seguridad desconocida o clasificada como tóxica por las agencias reguladoras ii) tienen limitaciones con respecto a la vía de administración iii) falta de reproducibilidad de fabricación iv) estabilidad del adyuvante.

60 Se ha informado previamente que los adyuvantes de emulsión (MF-59, AS03, AF3) proporcionan un fuerte efecto de reducción de dosis (> 30 veces) para las vacunas contra la influenza y la hepatitis B. Estos adyuvantes funcionan formando un depósito en el sitio de inyección, permitiendo la liberación controlada de material antigénico y la estimulación de células plasmáticas productoras de anticuerpos. Sin embargo, estos adyuvantes han sido considerados demasiado tóxicos para el uso generalizado de la vacuna profiláctica humana y generalmente se reservan para aquellas afecciones graves y / o terminales, como el cáncer, donde existe una mayor tolerancia a los efectos secundarios.

65

Además, las sales de aluminio se han considerado seguras, ya que se están utilizando en vacunas combinadas que contienen sIPV, tienen los obstáculos de desarrollo más bajos y su fabricación es económica. Sin embargo, los adyuvantes de aluminio no son conocidos por permitir una reducción significativa de la dosis.

5 Uno de los pasos más críticos en la producción de vacunas contra patógenos, en particular las vacunas virales, es la inactivación viral. En el caso de la inactivación del virus, la formalina es el agente inactivado más utilizado en la fabricación de vacunas. El formaldehído inactiva un virus al entrecruzar irreversiblemente grupos de aminas primarias en proteínas de superficie con otros átomos de nitrógeno cercanos en proteínas o ADN a través de un enlace -CH₂. Un problema potencial con el uso de formalina para la inactivación viral es que esto implica una serie de reacciones químicas que producen productos reactivos que pueden inducir la reticulación de proteínas virales y el agregado de partículas virales. Esto podría obstaculizar la eficacia de inactivación de la formalina y también podría provocar la destrucción parcial de la inmunogenicidad del antígeno en la vacuna. En consecuencia, se ha informado anteriormente que la inactivación de poliovirus con formalina podría afectar tanto la inmunogenicidad viral como la antigenicidad. Consulte Morag Ferguson y otros, *Journal of General Virology* (1993), 74, 685-690. Lo más importante, los métodos de inactivación de formaldehído previamente descritos se llevaron a cabo particularmente en presencia de solución reguladora fosfato en el que se observaron pérdidas significativas de antígeno D junto con la modificación del epítipo para Sabin de Tipo I / II / III (recuperación de antígeno D después de la inactivación: 22% para Sabin de Tipo I, 15% para Sabin de tipo II, y 25% para Sabin tipo III), por lo que no se conserva la conformación epitópica. Por lo tanto, es posible que los anticuerpos producidos por los receptores de poliovirus inactivados con formalina (en presencia de solución reguladora fosfato) no contribuyan a la respuesta inmunitaria protectora.

Al combinar la formalina y la inactivación UV, los científicos intentaron superar las limitaciones de la inactivación UV aislada o la inactivación de formalina, respectivamente, al inactivar el poliovirus particularmente resistente. Véase, por ejemplo, McLean, y otros, "Experiences in the Production of Poliovirus Vaccines", *Prog. Medicina. Virol.*, vol 1, p. 122-164 (1958.) Taylor y otros (*J. Immunol.* (1957) 79: 265-75) describen la inactivación del virus de la poliomielitis con una combinación de formalina y radiación ultravioleta. Molner y otros (*A.m. J. Pub. Health* (1958) 48: 590-8) describen la formación de un nivel medible de anticuerpos circulantes en la sangre de sujetos vacunados con la vacuna de poliomielitis inactivada con formalina y radiación ultravioleta. Truffelli y otros (*Appl. Microbiol* (1967) 15: 516-27) informan sobre la inactivación de Adenovirus y Tumorigenicidad de Virus de Simio 40 en hámsteres mediante un proceso de inactivación de tres etapas que consiste en formalina, luz UV y β -propiolactona (BPL). Miyamae (*Microbiol. Immunol.* (1986) 30: 213-23) describe la preparación de inmunógenos del virus Sendai mediante un tratamiento con rayos UV y formalina. Sin embargo, anteriormente se ha informado que las alternativas prometedoras para el formaldehído como la β -propiolactona (BPL) producen una reacción del complejo inmune cuando se combina con otros componentes de la vacuna contra la rabia. Además, se ha demostrado que produce carcinomas de células escamosas, linfomas y hepatomas en ratones.

Thomassen y otros *Biotec. a. Bioeng* 5 (110): 1354 - 1365 describen un proceso de producción de la vacuna de la poliomielitis inactivada.

Por lo tanto, es particularmente deseable emplear condiciones favorables de inactivación de formaldehído que mantengan la integridad estructural de las estructuras antigénicas de las cepas Sabin, así como utilizar adyuvantes seguros y rentables que pueden dar como resultado composiciones de vacunas sIPV (*Sabin IPV*) con dosis significativamente reducida (es decir, 8 a 10 veces) reduciendo así el costo de fabricación, aumentando los suministros de vacunas y haciendo que las vacunas sean accesibles para los países en desarrollo.

Los inventores de la presente invención han encontrado sorprendentemente que las pérdidas de antígeno D después de la inactivación post formaldehído podrían deberse a la presencia de solución reguladora fosfato que inesperadamente provoca una agregación indeseable del virus de la polio. La presente invención proporciona un proceso mejorado de inactivación de formaldehído en presencia de solución reguladora TRIS, asegurando así modificaciones mínimas epitópicas y, posteriormente, minimizando las pérdidas de antígeno D. Posteriormente se pueden obtener composiciones de vacunas Sabin IPV con dosis significativamente reducida con al menos 8 veces la reducción de dosis para Sabin de Tipo I y 3 veces la reducción de dosis para Sabin de Tipo III.

55 Descripción de las Figuras

Fig. 1: Gel de fosfato de aluminio preparado en *NaCl* al 0,9% (pH vs. potencial Zeta a diferentes concentraciones de gel de fosfato de aluminio)

Fig. 2: Gel de fosfato de aluminio preparado en *WFI* (pH vs. potencial de Zeta a diferentes concentraciones de gel de fosfato de aluminio)

Fig. 3: Gel de hidróxido de aluminio preparado en *NaCl* al 0,9% (pH vs. potencial Zeta a diferentes concentraciones de gel de hidróxido de aluminio)

Fig. 4: Gel de hidróxido de aluminio preparado en *WFI* (pH vs. potencial Zeta a diferentes concentraciones de gel de hidróxido de aluminio)

65 Descripción detallada

Un aspecto de la invención se refiere a un método para producir una composición de partículas de poliovirus inactivadas que comprende las etapas de: a) producir un medio que contiene las partículas de poliovirus; b) purificar las partículas desde el medio; c) recoger partículas en solución reguladora TRIS que tiene un pH de 6,8 a 7,2 y una concentración en el rango de 30mM–70mM, preferentemente 40mM; d) estabilizar las partículas al agregar un medio M-199 que contiene glicerina en una concentración final de 1x M-199 con 0,05% de glicerina; e) inactivar las partículas por incubación con 0,025% de formaldehído a 37°C de 5 a 13 días; f) adsorber las partículas en adyuvante de sal de aluminio, por lo que el porcentaje de adsorción en alumbre es de al menos 95%, y en donde la sal de aluminio es hidróxido de aluminio a una concentración entre dosis de 1,5 mg / 0,5 mL y dosis de 2,5 mg / 0,5 mL a un pH de aproximadamente 6,5.

Un aspecto importante es que dicho proceso mejorado de inactivación y adsorción de formalina en sal de alumbre comprende las siguientes etapas:

- a) Agregar el volumen purificado de Sabin IPV a la solución reguladora TRIS (30 a 50 mM) que tiene un pH de entre 6,8 a 7,2,
- b) Agregar un medio M-199 que contiene glicina (5 gm / l) a la mezcla de (a),
- c) Agregar formaldehído al 0,025% durante la mezcla,
- d) Incubar la mezcla obtenida en la Etapa (c) a 37 ° C de 5 a 13 días en un agitador magnético,
- e) Someter la mezcla post-incubación a filtración intermedia de 0,22 μ el día 7 y a filtración final el día 13,
- f) Almacenar el volumen obtenido después del paso (e) a 2-8 ° C,
- g) Realización de ELISA D-Ag para la determinación de la unidad de antígeno D,
- h) Tomar el volumen deseado de Al (OH)₃ autoclavado para obtener la concentración final de Alumbre (Al³⁺) entre 0,8 a 1,2 mg / dosis en un recipiente de 50 ml,
- i) Agregar el volumen sIPV con unidad D-Ag ajustada y completar el volumen con diluyente (10x M-199 + 0,5% de glicina),
- j) Ajustar el pH de la formulación final y obtener la formulación final con un pH entre 6 y 6,5,
- k) Someter el volumen de la formulación a una agitación magnética durante la noche a 2-8 ° C y en donde la inactivación de formalina de la etapa (a) no ocurre en presencia de solución reguladora fosfato.

Una realización preferida es que dicha inactivación de formaldehído puede ocurrir en presencia de solución reguladora TRIS o TBS (solución salina tamponada con TRIS) que tiene una concentración seleccionada de 30mM, 40mM y 50mM, preferiblemente 40mM y a un pH seleccionado de 6.8,6.9,7.7.1 y 7.2, preferiblemente entre 6.8 y 7.2 en donde dicha inactivación no utiliza ninguna solución reguladora fosfato.

Una segunda realización de la presente invención es que la adsorción de sIPV inactivada con formalina se puede hacer en hidróxido de aluminio que tiene una concentración seleccionada de 1,5 mg/dosis, 1,8 mg/dosis, 2,2 mg/dosis, preferiblemente de 2 mg/dosis a 2,4 mg/dosis y a un pH seleccionado de 6,2, 6,3, 6,4 y 6,5, preferiblemente 6,5.

Una tercera realización de la presente invención es que dicho proceso mejorado de inactivación de formalina y adsorción de hidróxido de aluminio puede dar como resultado la recuperación de antígeno D después de la inactivación entre 50% y 80% y el porcentaje de adsorción en hidróxido de aluminio puede estar entre 95 y 99%.

Un aspecto es que la presente invención proporciona un proceso mejorado de inactivación de formalina y adsorción de hidróxido de aluminio que da como resultado una reducción de la dosis de al menos 8 veces para Sabin de Tipo I, al menos 3 veces para Sabin de Tipo III en comparación con la dosis estándar de 40 DU-8DU-32DU. El segundo aspecto es la provisión de métodos mejorados de inactivación de formaldehído y adsorción de hidróxido de aluminio que dan como resultado composiciones de vacuna que comprenden i) poliovirus inactivado de tipo 1 en una dosis de al menos 5 unidades de antígeno D, ii) poliovirus inactivado de tipo 2 en una dosis de al menos 8 unidades de antígeno D y iii) poliovirus inactivado de tipo 3 en una dosis de al menos 10 unidades de antígeno D.

Una cuarta realización de la presente invención es que dicho adyuvante de sal de aluminio es un hidróxido de aluminio que tiene una concentración de entre una dosis de 1,5 mg / 0,5 ml y una dosis de 2,5 mg / 0,5 ml, preferiblemente de entre una dosis de 2,100 mg / 0,5 ml y una dosis de 2,4 mg / 0,5 ml a un pH de aproximadamente 6.5.

Un aspecto de la cuarta realización es que el contenido total de aluminio en la vacuna trivalente (Tipo 1, 2 y 3) puede estar entre 800-1000 μg, preferiblemente 800 μg Al³⁺ por dosis de 0,5 ml, caracterizado porque al menos 400 μg Al³⁺ para el Tipo 1, al menos 200 μg Al³⁺ para el Tipo 2, al menos 200 μg Al³⁺ para el Tipo 3.

Otro aspecto es que dicha composición de vacuna contra el virus de la poliomiélitis de dosis reducida puede consistir en Tipo 1 y Tipo 3 y carece de Tipo 2 en donde el volumen de dosis puede estar entre 0,1 y 0,4 ml.

Las composiciones de vacuna de dosis reducida preparadas por métodos instantáneos pueden ser i) "sIPV autónomo" en donde los antígenos pueden comprender sIPV de tipo 1 o sIPV de tipo 2 o sIPV de tipo 3, o sIPV de

tipos 1 y 2, o sIPV de tipos 1 y 3, o sIPV de tipos 2 y 3, o sIPV de tipos 1, 2 y 3 o ii) "Vacunas combinadas que contienen sIPV" en las que dichos antígenos no combinados de IPV de vacunas combinadas pueden seleccionarse de, pero no se limitan a, toxoide diftérico, toxoide tetánico, antígeno (s) de tos ferina de células enteras, antígeno (s) de tos ferina acelular, antígeno de superficie de hepatitis B, antígeno (s) de Haemophilus influenzae b, antígeno (s) de Neisseria meningitidis A, antígeno (s) de Neisseria meningitidis C, antígeno (s) de Neisseria meningitidis W-135, Antígeno (s) Neisseria meningitidis Y, antígeno (s) Neisseria meningitidis X, ampolla de Neisseria meningitidis B o antígeno (s) purificado, antígeno (s) de hepatitis A, antígeno (s) de Salmonella typhi, antígeno (s) de Streptococcus pneumoniae.

El o los antígenos no IPV pueden adsorberse en una sal de aluminio como el hidróxido de aluminio, una sal de aluminio como el fosfato de aluminio o en una mezcla de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio, o pueden no adsorberse.

El poliovirus puede crecer en cultivo celular. El cultivo celular puede ser una línea celular VERO o PMKC, que es una línea celular continua derivada del riñón de mono. Las células VERO pueden ser convenientemente micro portadores cultivados. Después del crecimiento, los viriones pueden purificarse utilizando técnicas tales como ultrafiltración, diafiltración y cromatografía. Antes de la administración a los pacientes, los virus deben inactivarse, y esto se puede lograr mediante el tratamiento con formaldehído.

Las composiciones pueden presentarse en viales, o pueden presentarse en jeringas precargadas. Las jeringas pueden suministrarse con o sin agujas. Una jeringa incluirá una dosis única de la composición, mientras que un vial puede incluir una dosis única o dosis múltiples (por ejemplo, 2 dosis). En una realización, la dosis es para humanos. En una realización adicional, la dosis es para un adulto, adolescente, niño pequeño, bebé o humano de menos de un año y puede administrarse por inyección.

Las vacunas producidas según los métodos de la invención pueden envasarse en forma de dosis unitaria o en forma de dosis múltiple (por ejemplo, 2 dosis).

Dicha composición de dosis múltiples se puede seleccionar de un grupo que consiste en 2 dosis, 5 dosis y 10 dosis. Para formas de dosis múltiples, se prefieren los viales a las jeringas precargadas. Los volúmenes de dosificación efectivos pueden establecerse de manera rutinaria, pero una dosis humana típica de la composición para inyección tiene un volumen de 0,5 ml.

Ejemplos:

Ejemplo 1

Purificación de Sabin IPV (sIPV)

1) Filtración de flujo tangencial (TFF):
El grupo de recolección se concentró a 10X utilizando un sistema de filtración de flujo tangencial con casetes de 100 Kda (0.5m²) y luego se diafiltró 3 veces el volumen de cosecha con solución reguladora fosfato (40 mM, pH: 7.0)

2) Cromatografía en columna:
La purificación se realizó por cromatografía de intercambio iónico (IEC). 10X TFF de concentrado se pasó a través de DEAE Sefarosa de flujo rápido (intercambiador de aniones débiles) compactado en la columna xk-26 utilizando explorador Akta (GE Healthcare). Se encontró que las impurezas de carga negativa se unieron a la columna, mientras que el virus de la polio se recogió en flujo con una solución reguladora fosfato de 40 mM.

3) Intercambio de solución reguladora TRIS:
Para minimizar la pérdida de antígeno en un procedimiento de inactivación bastante engorroso (13 días), el conjunto de virus purificado se intercambió con solución reguladora a partir de solución reguladora fosfato a solución reguladora TRIS (40 mM, pH: 7) con sistema TFF [100 KDa, 0,1 m²). El grupo de virus purificado se intercambió con tres volúmenes de solución reguladora tris.

Ejemplo 2

A) Inactivación de sIPV

Se agregó 10X M-199 concentrado con glicina al 0,5% para lograr una concentración final de 1X. Se añadió agente de inactivación formalina (0,025%) al volumen del virus purificado mientras se mezcló constantemente. La inactivación se llevó a cabo a 37 ° C mientras se agitó de forma continua durante 13 días, con una filtración de 0,22u el día 7 y el día 13.

B) Inactivación de sIPV en solución reguladora TRIS y solución reguladora fosfato

ES 2 803 578 T3

Se utilizó formaldehído al 0,025% para la inactivación durante 13 días a 37° C.

Tabla 1: Contenido de antígeno D, inactivación de Formalina en presencia de solución reguladora TRIS y solución reguladora fosfato.

	Contenido de Antígeno D (40mM tampón de fosfato durante inactivación)	Contenido de antígeno D (40mM de solución reguladora Tris durante inactivación)
Tipo 1	52,70 DU/ml	408,19 DU/ml
Tipo 2	22,63	180,20
Tipo 3	4,21	21,50

Cuando los métodos de inactivación de formaldehído se llevaron a cabo particularmente en presencia de solución reguladora fosfato, se observaron pérdidas significativas de antígeno D para Sabin de Tipo I. Mientras, se descubrió que la inactivación de formaldehído en presencia de solución reguladora TRIS resultó en una pérdida mínima de antígeno D.

Tabla 2: Diferentes concentraciones de solución reguladora TRIS utilizadas durante la inactivación.

	30mM	40mM	50mM
Tipo 1	500 DU/ml	576,80 DU/ml	585 DU/ml
Tipo 2	140 DU/ml	165,16 DU/ml	155 DU/ml
Tipo 3	16 DU/ml	21,17 DU/ml	19 DU/ml

Se descubrió que la solución reguladora TRIS a una concentración de 40mM es más eficiente en términos de preservación del contenido de antígeno D para sIPV 1, 2 y 3.

C) Determinación de antígeno D por ELISA.

Día 1: Recubrimiento de placa:

1. Se pipeteó 100 ul de antipoliomielitis bovina específica en PBS por pocillo.
2. Se selló y se incubó la placa de microtitulación durante la noche a temperatura ambiente.

Día 2: Bloqueo:

1. Se lavaron las placas (tampón de lavado / dilución -0,05% entre 20 en 1x PBS) 3 veces.
2. Se pipeteó el tampón de bloque 300 ul (BSA al 1% en PBS) por pocillo.
3. Se selló y se incubó la placa durante 45 minutos a 37 ± 1 ° C.

Adición de la muestra:

1. Se lavó la placa tres veces.
2. Se añadieron 100ul de diluyente de muestra en todos los pocillos, excepto en el pocillo de la fila A.
3. Se añadieron 100 µl estándar a los dos primeros pocillos de las columnas 2 y 3.
4. Se añadió una muestra 100ul a los dos primeros pocillos de la columna 4-12.
5. Muestra de predilución a una concentración adecuada.
6. Se agregaron diluyentes de muestra 100ul a los dos primeros pocillos de la columna 1.
7. Se hicieron diluciones en serie dobles en la columna transfiriendo 100 ul de cada pocillo a un pocillo adyacente de la misma columna y desechando 100 ul del último pocillo.
8. Incubación a 37 ° C durante 2 h.
9. Se mantuvieron las placas durante la noche a 4 ° C.

Día 3: Adición de anticuerpos monoclonales:

1. Se lavó la placa tres veces.

ES 2 803 578 T3

2. Se agregaron anticuerpos monoclonales específicos de tipo diluido 100ul (1: 240).
3. Se sellaron y se incubaron las placas durante 2 horas a 37 ° C.

Conjugado:

5

1. Se lavaron las placas tres veces.
2. Se añadieron 100 µl de conjugado diluido (Tipo 1: 1:2400, Tipo 2: 1:1500, Tipo 3 - 1:4800).
3. Se selló y se incubó la placa durante 1 hora a 37 ° C.

10 Adición de sustrato:

1. Se añadió 100ul de sustrato de TMB a todos los pocillos.
2. Mezcla incubada a temperatura ambiente durante 10 minutos.
3. Se detuvo la reacción mediante la adición de 100 ul 2 M H₂SO₄.
- 15 4. La placa se leyó a 450/630 nm.
5. La concentración de antígeno D se calculó utilizando el software KC4.

Ejemplo 3

20 Adsorción de sIPV:

1. Se utilizó para la preparación de formulaciones, stock de 1% autoclavado de Al (OH)₃ y AlPO₄.
2. Se tomó el volumen deseado de Al (OH)₃ / AlPO₄ para obtener la concentración requerida de alumbre en una botella de vidrio de 100 ml.
- 25 3. Se agregó el virus de la poliomielitis inactivado en grupo con la unidad D-Ag conocida y se completó el volumen con diluyente.
- 30 4. El pH de la formulación final se ajustó a 6,5 con 1 N HCl / NaOH.
5. Se mantuvo la formulación a granel en un agitador magnético durante la noche a 2-8 ° C.

Ejemplo 4

35

Estudios de pre formulación

Se prepararon diferentes concentraciones de Al (OH)₃ y AlPO₄ en solución salina al 0,9% y en WFI para verificar el tamaño y el potencial zeta con respecto al cambio en el pH.

40

Se observó que el potencial zeta de AlPO₄ disminuye (negatividad) con un aumento del pH de 5 a 7,5 en presencia de WFI, así como en solución salina (Consulte las Figuras 1 y 2).

45

Mientras que el potencial zeta de Al (OH)₃ en solución salina permanece constante, independiente del pH y la concentración de sal de Al (OH)₃ (Consulte las Figuras 3 y 4).

Ejemplo 5

50

Estudios de adsorción de sIPV sobre fosfato de aluminio e hidróxido de aluminio

Tabla 3: Adsorción de Sabin de tipo 1, 2 y 3 (título 10^{6.0}/ dosis) sobre alumbre (fosfato de alumbre e hidróxido de alumbre).

	Muestra	Título (por dosis)	Partículas de Virus (en K)	% libre en SUP	% adsorbido en gel
Tipo 1, AlOH ₃	Control	5,45	284	ND	
	Al ³⁺	4,15	14	4,98	95,02
	125ug/dosis				
	Al ³⁺	3,85	7	2,49	97,51
	250ug/dosis				
	Al ³⁺	3,8	6,3	2,24	97,78
	500ug/dosis				

(continuación)

	Muestra	Título (por dosis)	(por Partículas de Virus (en K)	% libre en SUP	% adsorbido en gel
Tipo 1, AlPO_4	Control	5,84	691	ND	
	Al^{3+} 125ug/dosis	3,49	3	0,43	99,57
	Al^{3+} 250ug/dosis	3,09	1,2	0,17	99,83
	Al^{3+} 500ug/dosis	2,94	0,87	0,12	99,87
	Control	5,49	309	ND	
Tipo 2, AlOH_3	Al^{3+} 125ug/dosis	3,59	3,89	1,25	98,75
	Al^{3+} 250ug/dosis	3,49	3,09	1	99
	Al^{3+} 500ug/dosis	3,49	3,09	1	99
	Control	5,49	309	ND	
	Tipo 2, AlPO_4	Al^{3+} 125ug/dosis	3,15	1,41	0,45
Al^{3+} 250ug/dosis		3,09	1,23	0,39	99,6
Al^{3+} 500ug/dosis		3,09	1,23	0,39	99,6
Control		5,59	389	ND	
Tipo 3, AlOH_3		Al^{3+} 125ug/dosis	4,14	13,8	3,54
	Al^{3+} 250ug/dosis	3,94	8,7	2,23	97,77
	Al^{3+} 500ug/dosis	3,54	3,4	0,87	99,13
	Control	5,59	389	ND	
	Tipo 3, AlPO_4	Al^{3+} 125ug/dosis	5,34	218	56,04
Al^{3+} 250ug/dosis		5,24	173	44,47	55,53
Al^{3+} 500ug/dosis		5,16	144	37,01	62,9

Se descubrió que el virus de la polio Sabin tipo 3 muestra solo un 50-60% de adsorción con fosfato de aluminio (AlPO_4). Mientras, el virus de la polio Sabin tipo 3 muestra al menos 90% de adsorción con $\text{Al}(\text{OH})_3$. Por lo tanto, se descubrió que el hidróxido de aluminio es más eficiente en comparación con el fosfato de aluminio con respecto a la adsorción de Sabin tipo 1,2 y 3.

5

Ejemplo 6

10 Estudios de inmunogenicidad de sIPV adsorbido en alumbre

ES 2 803 578 T3

Para verificar la respuesta inmune de sIPV con adyuvante en rata (Test de Neutralización en Suero), se realizó la prueba SNT. Se separó el suero y se usó para evaluar la presencia de anticuerpos neutralizantes para el virus de la polio del tipo específico. Sueros de control utilizados para validar la prueba. La retro valoración del virus también se realizó para obtener el número de partículas de virus de desafío añadidas.

5

Modelo animal: Rata Wistar (8 semanas, aprox. 200 gm) 50% machos y 50 % hembras por grupo.

Ruta de inoculación: Intramuscular.

Volumen: 0,5 ml

Extracción de sangre: el día 21.

10

Sitio de sangrado: Plexo retro orbitario.

Tabla 4: Tipo 1

Rata No	Grupo 1 Comm. IPV		Grupo 2 5 DU 1,15mgOH		Grupo 3 2,5DU 1,15mgOH		Grupo 4 1DU 1,15mgOH		Grupo 5 5DU 1,8mgPO4		Grupo 6 2,5DU 1,8mgPO4		Grupo 7 1DU 1,8mgPO4		Grupo 15 -ve control	
	SNT +ve	Título en Suero	SNT +ve	Título en Suero	SNT +ve	Título en Suero	SNT +ve	Título en Suero	SNT +ve	Título en Suero	SNT +ve	Título en Suero	SNT +ve	Título en Suero	SNT +ve	Título en Suero
1	1	(1:2)	8	(1:256)	1	(1:2)	4	(1:16)	5	(1:32)	5	(1:32)	2	(1:4)	0	(<1:2)
2	1	(1:2)	5	(1:32)	1	(1:2)	7	(1:128)	8	(1:256)	4	(1:16)	1	(1:2)	0	(<1:2)
3	0	(<1:2)	7	(1:128)	3	(1:8)	0	(<1:2)	4	(1:16)	6	(1:64)	0	(<1:2)	0	(<1:2)
4	0	(<1:2)	11	(1:2048)	2	(1:4)	2	(1:4)	1	(1:2)	5	(1:32)	0	(<1:2)	0	(<1:2)
5	7	(1:128)	3	(1:8)	7	(1:128)	5	(1:32)	6	(1:64)	4	(1:16)	1	(1:2)	0	(<1:2)
6	4	(1:16)	7	(1:128)	7	(1:128)	1	(1:2)	5	(1:32)	6	(1:64)	3	(1:8)	0	(<1:2)
7	3	(1:8)	5	(1:32)	4	(1:16)	1	(1:2)	8	(1:256)	7	(1:128)	0	(<1:2)	0	(<1:2)
8	1	(1:2)	7	(1:128)	3	(1:8)	2	(1:4)	6	(1:64)	0	(<1:2)	0	(<1:2)	0	(<1:2)
9	3	(1:8)	8	(1:256)	2	(1:4)	3	(1:8)	8	(1:256)	4	(1:16)	4	(1:16)	0	(<1:2)
10	3	(1:8)	7	(1:128)	4	(1:16)	5	(1:32)	6	(1:64)	2	(1:4)	2	(1:4)	0	(<1:2)

Sorprendentemente, se descubrió que IPV Sabin Tipo 1 adyuvado con hidróxido de aluminio que tenía 5 DU / dosis daba una mejor seroconversión en comparación con la vacuna Salk IPV con 40DU / dosis y Sabin IPV adyuvado con fosfato de aluminio que tenía 5 DU / dosis.

5

Tabla 5: Tipo 2

No	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
	Adyuvante Al(OH) ₃					
	4DU (0,6mgOH)		8DU (0,6mgOH)		16DU 0,6mgOH	
	SNT +ve	Título en Suero	SNT +ve	Título en Suero	SNT +ve	Título en Suero
1	3	(1:8)	4	(1:16)	7	(1:128)
2	4	(1:16)	6	(1:64)	5	(1:32)
3	0	(<1:2)	3	(1:8)	5	(1:32)
4	3	(1:8)	4	(1:16)	6	(1:64)
5	5	(1:32)	7	(1:128)	6	(1:64)
6	6	(1:64)	4	(1:16)	9	(1:512)
7	4	(1:16)	7	(1:128)	4	(1:16)
8	5	(1:32)	3	(1:8)	8	(1:256)
9	7	(1:128)	8	(1:256)	8	(1:256)
10	5	(1:32)	3	(1:8)	8	(1:256)

El sIPV tipo 2 que tiene 8 DU / dosis con adyuvante proporcionó una conversión serológica equivalente en comparación con la vacuna Salk IPV con 8DU / dosis.

10

Tabla 6: Tipo 3

Rata No	Grupo 1		Grupo 2		Grupo 3	
	Adyuvante Al(OH) ₃					
	10DU 0,6mgOH		5DU 0,6mgOH		2,5DU 0,6mgOH	
	SNT +ve	Título en Suero	SNT +ve	Título en Suero	SNT +ve	Título en Suero
1	3	(1:8)	2	(1:4)	0	(<1:2)
2	0	(<1:2)	5	(1:32)	1	(1:2)
3	2	(1:4)	3	(1:8)	1	(1:2)
4	4	(1:16)	2	(1:4)	0	(<1:2)
5	4	(1:16)	2	(1:4)	1	(1:2)
6	4	(1:16)	1	(1:2)	1	(1:2)
7	9	(1:512)	0	(<1:2)	2	(1:4)
8	7	(1:128)	2	(1:4)	2	(1:4)
9	1	(1:2)	0	(<1:2)	1	(1:2)
10	5	(1:32)	7	(1:128)	1	(1:2)

Se descubrió que sIPV tipo 3 que tenía 10DU / dosis con adyuvante daba una conversión serológica equivalente en comparación con la vacuna Salk IPV con 32DU / dosis.

15

Tabla 7: Reducción de la dosis máxima observada para Sabin individual Tipo 1, 2 y 3 después de los estudios.

sIPV	Dosis estándar	Dosis *SIIL	Reducción de dosis
Tipo 1	40DU	5DU	~8 veces
Tipo 2	8DU	8DU	Equivalente
Tipo 3	32DU	10DU	~3 veces

SIIL: Preparación interna de IPV de dosis reducida de Serum Institute of India

En vista de las muchas formas posibles de realización a las que se pueden aplicar los principios de la invención descrita, debe reconocerse que las formas de realización ilustradas son solo ejemplos preferidos de la invención. Más bien, el alcance de la invención está definido por las siguientes reivindicaciones. Por lo tanto, reivindicamos como nuestra invención todo lo que se encuentra dentro del alcance de estas reivindicaciones.

20

REIVINDICACIONES

1. Un método para producir una composición que comprende partículas de poliovirus inactivado, caracterizado porque comprende las etapas de:
- 5 a) producir un medio que contiene partículas de poliovirus,
b) purificar las partículas desde el medio,
c) recoger partículas en solución reguladora TRIS que tiene un pH de 6,8 a 7,2 y una concentración en el rango de 30mM–70mM, preferentemente 40mM,
- 10 d) estabilizar las partículas al agregar un medio M-199 que contiene glicerina en una concentración final de 1x M-199 con 0,05% de glicerina,
e) inactivar las partículas por incubación con 0,025% de formaldehído a 37°C de 5 a 13 días,
f) adsorber las partículas en adyuvante de sal de aluminio, por lo que el porcentaje de adsorción en alumbre es de al menos 95%, y en donde la sal de aluminio es hidróxido de aluminio a una concentración entre dosis de
- 15 1,5mg/0,5ml y dosis de 2,5mg/0,5ml a un pH de aproximadamente 6,5.
2. Un método de acuerdo con la reivindicación 1, caracterizado porque la composición que comprende partículas de poliovirus es una vacuna.
- 20 3. Un método de acuerdo con la reivindicación 2, caracterizado porque el contenido total de aluminio en una vacuna trivalente es menor que 1,2mg, preferentemente 0,8mg de Al³⁺ por dosis de 0,5ml, y al menos 0,4mg de Al³⁺ para el Tipo 1, al menos 0,2mg de Al³⁺ para el Tipo 2, al menos 0,2mg de Al³⁺ para el Tipo 3.
- 25 4. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque las partículas de poliovirus comprenden poliovirus de Sabin serotipos 1, 2 y 3.
5. Un método de acuerdo con la reivindicación 3, caracterizado porque las partículas del poliovirus comprenden poliovirus de Salk IPV de tipo 1 (cepa Mahoney), IPV de tipo 2 (cepa MEF-1) y/o IPV de tipo 3 (cepa Saukett).
- 30 6. Un método de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, caracterizado porque la vacuna es una Vacuna de la Poliomiélitis Inactivada de dosis reducida (IPV), preferentemente en donde la reducción de la dosis es de al menos 3 veces para Sabin de Tipo III.
- 35 7. Un método de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 6, caracterizado porque la Vacuna para la Poliomiélitis Inactivada de dosis reducida comprende:
- poliovirus inactivado de tipo 3 en una dosis de entre 6 y 11 unidades de antígeno D en vez de dosis estándar de 32DU.

Figura 1

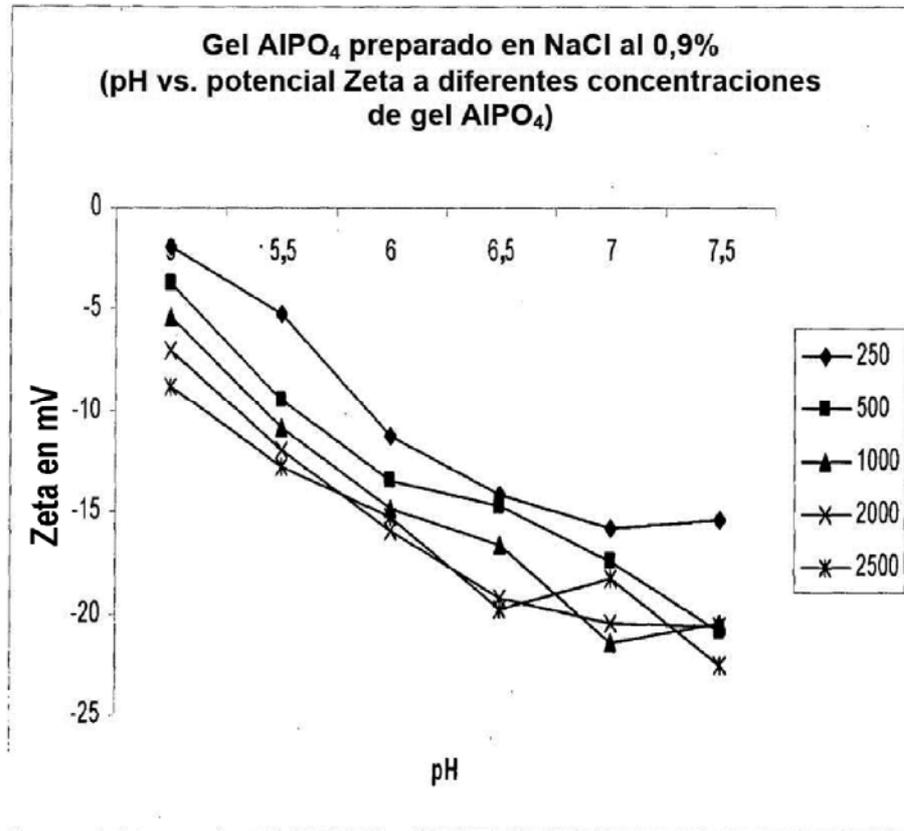


Figura 2

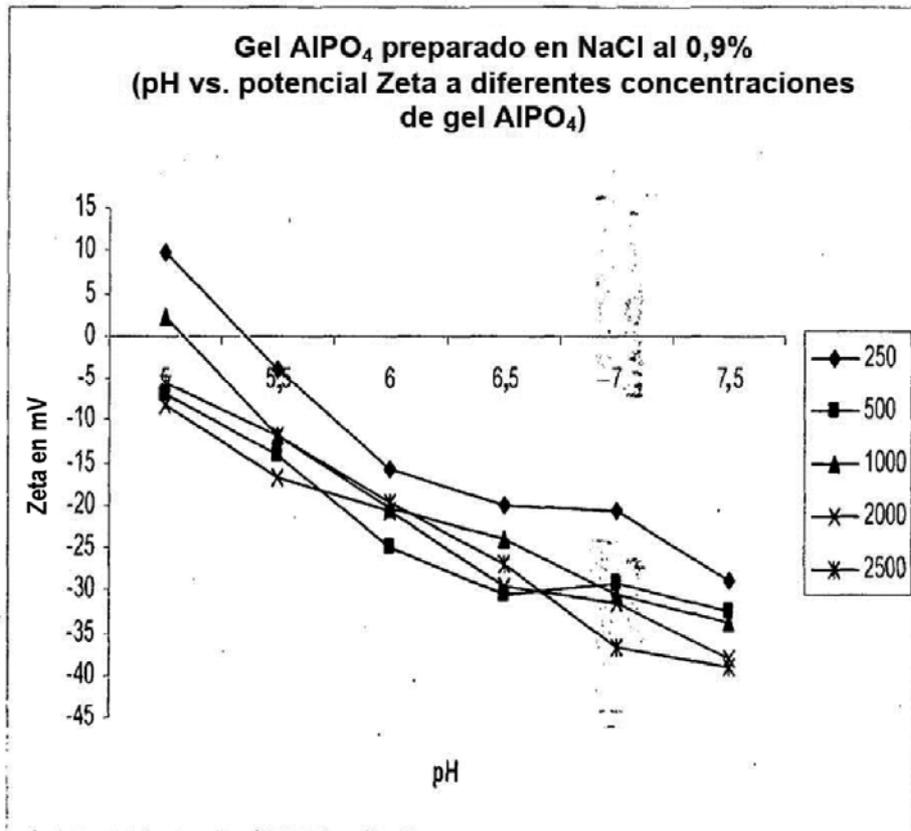


Figura 3

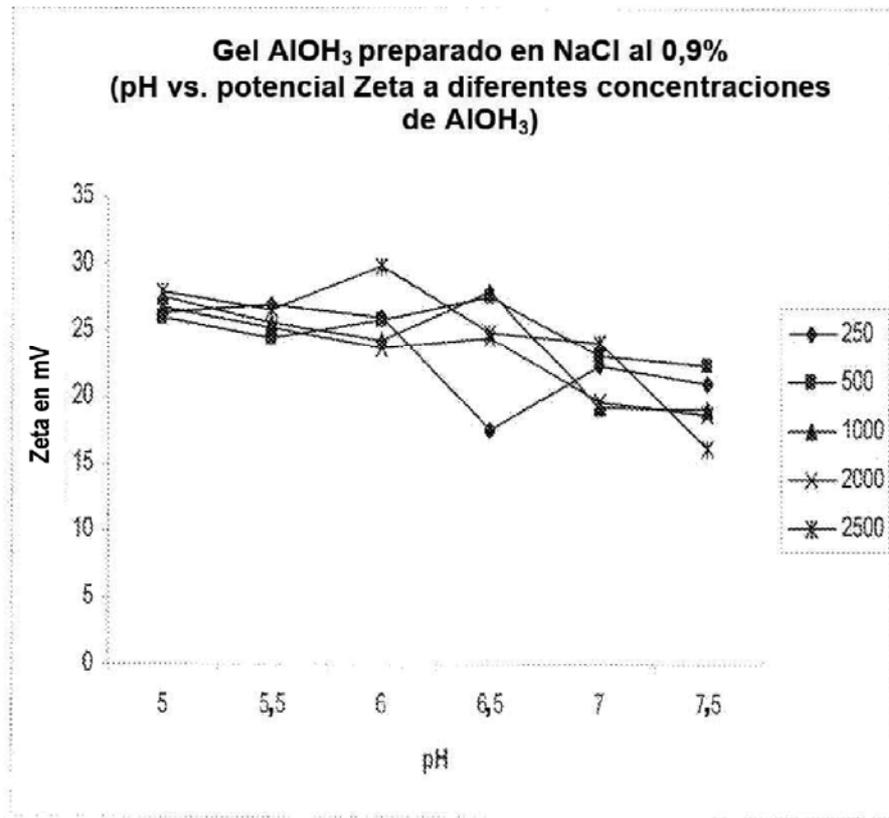


Figura 4

