

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 649 020**

51 Int. Cl.:

C07K 14/18 (2006.01)

A61K 39/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **16.02.2010 PCT/EP2010/051882**

87 Fecha y número de publicación internacional: **26.08.2010 WO10094663**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **16.02.2010 E 10709443 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.08.2017 EP 2398821**

54 Título: **Vacuna inactivada del virus del dengue con adyuvante libre de aluminio**

30 Prioridad:

17.02.2009 US 153060 P

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

09.01.2018

73 Titular/es:

**GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (100.0%)
Rue de l'Institut, 89
1330 Rixensart, BE**

72 Inventor/es:

**BARAS, BENOIT;
GHEYSEN, DIRK;
KNOTT, ISABELLE, SOLANGE, LUCIE;
PRIEELS, JEAN-PAUL y
TOUSSAINT, JEAN-FRANCOIS**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 649 020 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

Vacuna inactivada del virus del dengue con adyuvante libre de aluminio

Campo de la técnica

- 5 La presente divulgación se refiere a composiciones que dan lugar a una respuesta inmunitaria contra el virus del dengue. Más específicamente, la presente divulgación se refiere a vacunas inactivadas del virus del dengue que incluyen un adyuvante.

Antecedentes

- 10 El dengue es una enfermedad vírica aguda del hombre que se transmite por mosquitos. Es endémica de los trópicos y subtropicales, por todo el mundo, donde se producen anualmente una estimación de 100.000.000 de casos. Aunque relativamente raros, la fiebre hemorrágica del dengue (DHF) y el síndrome de choque por dengue (DSS) son causas significativas de muerte en niños. Actualmente, no existe una vacuna para proteger contra el dengue y los intentos para prevenir la enfermedad controlando el mosquito vector han demostrado que son muy ineficaces. Por lo tanto, sigue existiendo una necesidad de una vacuna segura y eficaz para proteger contra la enfermedad por el virus del dengue. El documento US6254873 desvela una vacuna inactivada de virus del dengue para inmunizar y proteger seres humanos contra la fiebre del dengue.

Breve resumen

- 20 La presente invención proporciona una composición inmunogénica para su uso en la administración a un ser humano que comprende al menos un virus del dengue completo inactivado y un adyuvante libre de aluminio, en el que el adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol, y monooleato de polioxietileno sorbitán, y en el que la emulsión de aceite en agua no contiene ningún inmunoestimulante adicional. También se describen procedimientos para su uso, por ejemplo, en la formulación de medicamentos, para la prevención o tratamiento de la enfermedad producida por el virus del Dengue.

Breve descripción de los dibujos

- 25 La FIG. 1 es un gráfico de barras que ilustra los títulos de anticuerpo neutralizante Anti-Den-2 en ratones C57B1/6 intactos.
La FIG. 2 es un gráfico de barras que ilustra los títulos de anticuerpo neutralizante Anti-Den-2 en ratones C57B1/6 intactos.
30 La FIG. 3 es un gráfico de barras que ilustra los títulos de anticuerpo neutralizante Anti-Den-2 en ratones C57B1/6 intactos.
La FIG. 4 es un gráfico de barras que ilustra una caracterización de la respuesta inmunitaria celular mediante tinción de citocinas intracelulares en células sanguíneas periféricas.

Descripción detallada

INTRODUCCIÓN

- 35 La presente invención se refiere a una vacuna que satisface la necesidad de una vacuna del dengue segura y eficaz. Las vacunas inactivadas purificadas del virus del dengue tienen una ventaja principal sobre el virus del dengue atenuado ya que los virus inactivados no son infecciosos, y por lo tanto, no pueden revertir la virulencia o producir la enfermedad. Un inconveniente potencial de la vacuna inactivada del virus del dengue purificado en comparación con una viva atenuada es la capacidad reducida de inducir altos títulos de anticuerpos neutralizantes específicos del dengue y la relativamente corta duración de la respuesta inmunitaria protectora. Este inconveniente se supera por la formulación del antígeno del dengue inactivado purificado con un adyuvante apropiado.

- 40 Las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento incluyen al menos uno (es decir, uno o más de uno) virus del dengue completos inactivados, en combinación con el adyuvante libre de aluminio. El virus del dengue completo inactivado se puede seleccionar de entre un virus del Dengue-1, un virus del Dengue-2, un virus del Dengue-3 y un virus del Dengue-4. Por lo tanto, la composición inmunogénica puede ser una composición monovalente que incluye un único virus del dengue completo inactivado de una única cepa seleccionada de entre Dengue-1, Dengue-2, Dengue-3 o Dengue-4, o la composición puede ser una composición multivalente (por ejemplo, bivalente, trivalente, tetravalente) que contiene virus del dengue completo inactivado de más de una de estas cepas de dengue. En una realización ejemplar, la composición inmunogénica incluye un virus Dengue-2
45 completo inactivado. Por ejemplo, la composición inmunogénica puede ser una composición monovalente que contiene un antígeno de Dengue-2 completo inactivado. De manera alternativa, la composición inmunogénica puede ser una composición bivalente, trivalente o tetravalente que contiene un virus del Dengue-2 completo inactivado en combinación con uno, dos o tres virus del dengue completo inactivado. Por ejemplo, en una realización, la composición es una composición tetravalente que incluye un virus del Dengue-1 completo inactivado, un virus del
50

dengue-2 completo inactivado, un antígeno del virus el Dengue-3 completo inactivado y un virus del Dengue-4 completo inactivado.

El uno o más virus del dengue completo inactivado se formulan con el adyuvante que está libre de aluminio o sales de aluminio y en el que el adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol, y monooleato de polioxietileno sorbitán, y en el que la emulsión de aceite en agua no contiene ningún inmuoestimulante adicional. La emulsión de aceite en agua también contiene un componente acuoso, tal como una solución salina tampón (por ejemplo, solución salina tampón de fosfato). En realizaciones ejemplares, la emulsión de aceite en agua contiene escualeno y alfa tocoferol en una relación que es igual o menor a 1 (p/p).

En un ejemplo específico, la composición inmunogénica incluye un sistema de adyuvante de emulsión de aceite en agua en una dosis que comprende: desde aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 10 % de escualeno; desde aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 10 % de alfa-tocoferol; y desde aproximadamente un 0,3 % a aproximadamente un 3 % de monooleato de polioxietileno sorbitán. Por ejemplo la composición inmunogénica puede incluir un adyuvante formulado en una dosis que comprende: desde aproximadamente 10 mg a aproximadamente 12 mg de escualeno; desde aproximadamente 10 mg a aproximadamente 12 mg de alfa-tocoferol; y desde aproximadamente 4 mg a aproximadamente 6 mg de monooleato de polioxietileno sorbitán. En un ejemplo específico, el adyuvante se incluye en una dosis (completa) única: 10,68 mg de escualeno; 11,86 mg de tocoferol; 4,85 mg de monooleato de polioxietileno sorbitán. En otras realizaciones, la composición inmunogénica se formula en una fracción de la dosis (es decir, una dosis que es una fracción de las formulaciones de dosis única precedentes, tal como la mitad de la cantidad precedente de componentes, 1/4 de la cantidad precedente de componentes, u otra fracción de la dosis, por ejemplo, 1/3, 1/6, etc.) de la cantidad precedente de componentes.

En otro aspecto, la presente divulgación se refiere a un procedimiento para producir una vacuna de dengue que comprende las siguientes etapas: proporcionar al menos un virus del dengue completo inactivado purificado; y, formular el al menos un virus de dengue completo inactivado purificado con un adyuvante libre de aluminio, en el que el adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y monooleato de polioxietileno sorbitán y en el que la emulsión de aceite en agua no contiene ningún estimulante adicional. Por ejemplo, la composición inmunogénica se puede formular con un virus completo producido a partir de una cepa virulenta o atenuada, que se ha inactivado. Por ejemplo, el virus vivo (virulento o atenuado) se puede destruir, haciéndolo incapaz para la replicación, utilizando agentes químicos, tales como el formaldehído, betapropiolactona (BPL), o peróxido de hidrógeno, o utilizando radiación ultravioleta, o utilizando una combinación de dos o más etapas de inactivación (que pueden ser la misma o diferentes, por ejemplo, formaldehído y BPL, formaldehído y radiación UV, BPL y radiación UV, peróxido de hidrógeno y BPL, peróxido de hidrógeno y radiación UV, etc., en cualquier combinación).

La administración de la composición inmunogénica puede ser a un niño, tal como un niño menor de 5 años de edad, o menor de 1 año de edad. La composición inmunogénica se puede administrar a un sujeto intacto menor de 1 año de edad. La composición inmunogénica puede administrarse a un sujeto adulto, tal como un sujeto anciano mayor de aproximadamente 60 o 65 años de edad. Dichos sujetos se pueden exponer previamente al virus del dengue. Normalmente, la vacuna se administra por vía parenteral, por ejemplo intramuscular. La composición inmunogénica se puede utilizar en medicina, por ejemplo, para la prevención, mejora o tratamiento de la infección por el virus del dengue o la enfermedad inducida por el virus del dengue, tal como la fiebre hemorrágica (DHF) y el síndrome de choque por dengue (DSS).

TÉRMINOS

Con el objetivo de facilitar la revisión de distintas realizaciones de la presente divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de los términos. Se pueden proporcionar términos y explicaciones adicionales en el contexto de la presente divulgación.

A menos de que se explique otra cosa, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende habitualmente un experto habituado en la técnica a la que pertenece la presente divulgación. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, Genes V, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew y col. (eds.), The Encyclopedic of Molecular Biology, publicada por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (ed.), Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference, publicada por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Los términos “un”, “una” y “el” en singular incluyen los referentes en plural a menos de que el contexto indique claramente otra cosa. De manera similar, la palabra “o” tiene la intención de incluir “y” a menos de que el contexto indique claramente otra cosa. El término “pluralidad” se refiere a dos o más. Se tiene que entender adicionalmente que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores del peso molecular o masa molecular, que se dan para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan como descripción. De manera adicional, las limitaciones numéricas que se dan con respecto a las concentraciones o niveles de una sustancia, tal como un antígeno, tienen la intención de ser aproximados. Por lo tanto, cuando una concentración se indique que es al menos (por ejemplo) 200 pg, se tiene la intención que se entienda que es al

menos aproximadamente (o “aproximadamente” o “~”) 200 pg.

Aunque se pueden utilizar procedimientos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente divulgación, se describen posteriormente procedimientos y materiales adecuados. El término “comprende”, y variaciones tales como “comprender” y “que comprende” se entenderá que implica la inclusión de un compuesto o composición establecida (por ejemplo, un ácido nucleico, polipéptido, antígeno) o etapa, o grupo de compuestos o etapas, pero no la exclusión de cualquier otro compuesto, composición, etapas, o grupos de los mismos. La abreviatura, “e.g.” se deriva del latín *exempli gratia*, y se utiliza en el presente documento para indicar un ejemplo no limitante. Por lo tanto la abreviatura “e.g.” es sinónimo de la expresión “por ejemplo”.

Una “composición inmunogénica” es una composición de material adecuado para la administración a un sujeto humano o animal (por ejemplo, en un cuadro experimental) que es capaz de dar lugar a una respuesta inmunitaria específica, por ejemplo, contra un agente patógeno, tal como un virus del dengue. Como tal, una composición inmunogénica incluye uno o más antígenos (por ejemplo, un virus completo purificado o subunidades antigénicas, por ejemplo, polipéptidos, del mismo) o epítosos antigénicos. Una composición inmunogénica puede incluir también uno o más componentes adicionales capaces de dar lugar o aumentar una respuesta inmunitaria, tal como un excipiente, vehículo, y/o adyuvante. En ciertos casos, las composiciones inmunogénicas se administran para dar lugar a una respuesta inmunitaria que protege al sujeto contra síntomas o afecciones inducidas por un agente patógeno. En algunos casos, los síntomas o enfermedad producida por un agente patógeno se evita (o se trata, por ejemplo, se reduce o mejora) inhibiendo la replicación del agente patógeno (por ejemplo, el virus del dengue) a continuación de la exposición del sujeto al agente patógeno. En el contexto de esta divulgación, la expresión composición inmunogénica se entenderá que engloba las composiciones que se tiene la intención de administrar a un sujeto o población de sujetos con el objetivo de dar lugar a una respuesta inmunitaria protectora o paliativa contra el dengue (es decir, composiciones vacunales o vacunas).

El término “purificación” (por ejemplo, con respecto a un agente patógeno o una composición que contiene el agente patógeno) se refiere al procedimiento de eliminar componentes de una composición, cuya presencia no se desea. La purificación es un término relativo, y no es necesario que se elimine toda traza de componente no deseable de la composición. En el contexto de la producción de una vacuna, la purificación incluye procedimientos tales como centrifugación, diálisis, cromatografía de intercambio iónico, y cromatografía de exclusión por tamaño, purificación de afinidad o precipitación. Por lo tanto, el término “purificado” no necesita una pureza absoluta; más bien, se entiende como un término relativo. Por lo tanto, por ejemplo, una preparación vírica purificada es en la que el virus está más enriquecidos de lo que está en su ambiente generativo, por ejemplo, en una célula o población de células en la que se replica naturalmente o en un ambiente artificial. Se puede purificar una preparación de virus sustancialmente puros de manera que el virus o componente vírico deseado representa al menos un 50 % del contenido proteico total de la preparación. En ciertas realizaciones, un virus sustancialmente puro representará al menos un 50 % del contenido proteico total de la preparación. En ciertas realizaciones, un virus sustancialmente puro representará al menos un 60 %, al menos un 70 %, al menos un 80 %, al menos un 85 %, al menos un 90 %, o al menos un 95 % o más del contenido proteico total de la preparación.

Un componente biológico “aislado” (tal como un virus, molécula de ácido nucleico, proteína u orgánulo) se ha separado o purificado sustancialmente de otros componentes biológicos de la célula y/u organismo en el que se encuentra o se produce el componente. Los virus y componentes víricos, por ejemplo, proteínas que se han “aislado” incluyen virus, y proteínas purificados por procedimientos de purificación convencionales. El término también abarca virus y componentes víricos (tales como proteínas víricas) preparados por expresión recombinante en una célula huésped.

Un “antígeno” es un compuesto, composición, o sustancia que puede estimular la producción de anticuerpos y/o una respuesta de linfocitos T en un animal, incluyendo composiciones que se inyectan, absorben o se introducen de otra manera en un animal. El término “antígeno” incluye todos los epítosos antigénicos relacionados. El término “epítopo” o “determinante antigénico” se refiere a un sitio en un antígeno al que responden las células B y/o T. Los “epítosos antigénicos determinantes” o “epítopo dominante” son los epítosos contra los que se produce una respuesta inmunitaria del huésped funcionalmente significativa, por ejemplo, una respuesta de anticuerpos o una respuesta de linfocitos T. Por lo tanto, con respecto a una respuesta inmunitaria protectora contra un agente patógeno, los epítosos antigénicos dominantes son los restos antigénicos que cuando se reconocen por el sistema inmunitario del huésped dan como resultado la protección de la enfermedad producida por el agente patógeno. La expresión “epítopo de linfocito T” se refiere a un epítopo que cuando se une a una molécula del MHC apropiado se une específicamente a un linfocito T (mediante un receptor de linfocito T). Un “epítopo de linfocito B” es un epítopo que se une específicamente a un anticuerpo (o molécula receptora de linfocito B).

En el contexto de la presente divulgación, un virus del dengue es un virus completo inactivado.

Un “adyuvante” es un agente que aumenta la producción de una respuesta inmunitaria específica de antígeno en comparación con la administración del antígeno en ausencia del agente. Los adyuvantes comunes incluyen adyuvantes que incluyen aluminio que incluyen una suspensión de minerales (o sales minerales, tales como el hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, hidroxifosfato de aluminio) en el que se adsorbe el antígeno. En el

contexto de la presente divulgación los adyuvantes son adyuvantes libres de aluminio (alum), que se formulan en ausencia de algunas de dichas sales de aluminio. Los adyuvantes libres de alum incluyen emulsiones de aceite en agua, tales como de agua en aceite, y aceite en agua (y variantes de las mismas, que incluyen emulsiones dobles y emulsiones reversibles), oligosacáridos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos inmunoestimulantes (tales como oligonucleótidos CpG), liposomas, agonistas de receptores tipo Toll (particularmente agonistas de TLR2, TLR4, TLR7/8, y TLR9), y distintas combinaciones de dichos componentes.

Una "respuesta inmunitaria" es una respuesta de una células del sistema inmunitario, tal como un linfocito B, un linfocito T, o monocito, frente a un estímulo. Una respuesta inmunitaria puede ser una respuesta de un linfocito B, que da como resultado la producción de anticuerpos específicos, tales como anticuerpos neutralizantes específicos del antígeno. Una respuesta inmunitaria también puede ser una respuesta de linfocitos T, tal como una respuesta CD4+ o una respuesta CD8+. En algunos casos, la respuesta es específica para un antígeno particular (es decir, una "respuesta específica del antígeno"). Se el antígeno se deriva de un agente patógeno, la respuesta específica de antígeno es una "respuesta específica del agente patógeno". Una "respuesta inmunitaria protectora" es una respuesta inmunitaria que inhibe la función o actividad perjudicial de un agente patógeno, reduce la infección por un agente patógeno, o disminuye los síntomas (incluso la muerte) que resulta de la infección por un agente patógeno. Una respuesta inmunitaria protectora se puede medir, por ejemplo, por la inhibición de la replicación vírica o la formación de placas en un ensayo de reducción de placas o un ensayo ELISA de neutralización, o midiendo la resistencia a un desafío con el agente patógeno *in vivo*.

Una respuesta inmunitaria con tendencia "Th1" se caracteriza por la presencia de linfocitos T auxiliares CD4+ que producen IL-2 e IFN- γ , y por lo tanto, por la secreción o presencia de IL-2 e IFN- γ . Por el contrario una respuesta inmunitaria con tendencia "Th2" se caracteriza por una preponderancia de células auxiliares CD4+ que producen IL-4, IL-5 e IL-3.

Un "sujeto" es un organismo vertebrado multicelular vivo. En el contexto de la presente divulgación, el sujeto puede ser un sujeto experimental, tal como un animal no humano, por ejemplo, un ratón, una rata algodón, o un primate no humano. De manera alternativa, el sujeto puede ser un sujeto humano.

Las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento son adecuadas para prevenir, mejora y/o tratar la enfermedad producida por la infección con el virus del dengue.

Las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento incluyen uno o más virus del dengue completos inactivados purificados. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas pueden incluir una única cepa del virus del dengue (es decir, una composición monovalente), o pueden contener más de una cepa del virus del dengue (es decir, una composición multivalente). Normalmente, una composición multivalente contiene cepas seleccionadas de entre diferentes serotipos. Debido a que hay cuatro serotipos de virus del dengue que pueden producir la enfermedad, es decir, el dengue tipo uno (DEN-1), dengue tipo dos (DEN-2), dengue tipo tres (DEN-3) y dengue tipo cuatro (DEN-4), y debido a que los anticuerpos no neutralizantes de reacción cruzada predisponen a formas más graves de la enfermedad del dengue, se puede seleccionar un representante de cada serotipo para incluirlo en la vacuna final con el fin de garantizar la protección contra la enfermedad de cualquiera de los cuatro serotipos. Por lo tanto, en una realización, la composición inmunogénica es una composición tetravalente que incluye cepas seleccionadas de cada uno de los cuatro serotipos de virus del dengue.

Los virus que se utilizan como antígenos se pueden seleccionar a partir de esencialmente cualquier cepa (o cepas) del virus del dengue. Por ejemplo, se puede seleccionar una cepa vírica de cada serotipo, que se escoge basándose en su conformidad con respecto a una secuencia definida (por ejemplo, de consenso) para el serotipo, tal como una secuencia de consenso DEN-1, una secuencia de consenso DEN-2, una secuencia de consenso DEN-3, o una secuencia de consenso DEN-4. Dicho virus puede ser de origen natural o sintético. De manera alternativa, se puede seleccionar una cepa vírica que se correlacione con la cepa prevalente en el área o población en la que se pretende administrar la vacuna. Otra opción es seleccionar cepas para cada tipo según una cuestión de conveniencia basada en la disponibilidad o la experiencia anterior. Por ejemplo, se describen cepas ejemplares en la Patente de EE. UU N° 6.254.873, que se incorpora en el presente documento por referencia. Se desvelan cepas adicionales adecuadas, por ejemplo, en la Patente de EE. UU N° 7.226.602. Se pueden encontrar cepas adicionales, por ejemplo, en la base de datos de genomas víricos VBRC (http://athena.bioc.uvic.ca/organisms/Flaviviri-dae/Dengue/Curated_genes), y la base de datos de virus del Dengue (<http://www.broad.mit.edu/annotation/viral/Dengue/ProjectInfo.html>).

En el contexto de una vacuna del virus de dengue completo inactivado purificado, se pueden utilizar cepas virulentas o atenuadas. Normalmente las cepas virulentas se propagan con un título mayor en las células huésped, facilitando la producción a escala comercial. Sin embargo, las cepas virulentas necesitan tener un especial cuidado en su manejo para evitar la infección en el personal implicado en la fabricación. Las cepas atenuadas, por ejemplo, que se desarrollan por la adaptación a la producción en células cultivadas y la selección por la virulencia reducida y/o la replicación reducida en los mosquitos vectores del dengue, necesitan menos precauciones de manejo pero pueden ser difíciles de producir. Las cepas atenuadas ejemplares adecuadas para su uso en el contexto de una composición inmunogénica que contienen un virus del dengue inactivado y un adyuvante libre de aluminio se describen en el documento WO 00/57907 y la Patente de EE. UU N° 6.638.514, y los documentos WO 00/58444 y US 6.613.556, que se incorporan en el presente documento por referencia. Por lo tanto, las cepas seleccionadas se escogen

normalmente de entre las numerosas cepas disponibles para replicarse en células que son adecuadas para la producción de materiales concebidos para su uso en seres humanos (por ejemplo, células que se han certificado libres de agentes patógenos). Por ejemplo, se pueden explorar las cepas para identificar los virus que crecen con los títulos mayores, por ejemplo de un título de al menos 5×10^6 ufp/ml, preferentemente al menos 1×10^7 ufp/ml o más en las líneas celulares de elección; (ii) que se seleccionan de las cepas de virus del dengue que crecen con los títulos mayores en las líneas celulares de elección; y (iii) que más se adaptan a las cepas seleccionadas por el aumento de crecimiento por pasajes adicionales desde una a varias veces en las líneas celulares de elección. Los virus seleccionados (por ejemplo, escogidos de entre los cuatro serotipos de virus del dengue) se pueden adaptar adicionalmente para crecer con títulos altos por pasajes adicionales en cultivos celulares o por modificación genética para producir una muestra madre con alta titulación y la producción de lotes de semillas.

Las líneas celulares para propagar el virus del dengue incluyen células de mamífero, tales como células Vero, células AGMK, células BHK-21, células COS-1 o COS-7, células MDCK, células CV-1, células LLC-MK2, líneas celulares primarias tales como células de pulmón de Rhesus fetal (FRhL-2), células BSC-1, y células MRC-5, o fibroblastos diploides humanos, así como células aviares, líneas celulares derivadas de embriones de pollo o pato, por ejemplo, células AGE-1, y fibroblastos embrionarios de pollo, primarias, y líneas celulares de mosquito tales como C6/36. Preferentemente, las células escogidas se adaptan al crecimiento en ausencia de suero o proteínas derivadas del suero, y pueden mantener la replicación del virus del dengue con títulos altos en condiciones de crecimiento libre de suero (y/o libre de proteínas).

Para propagar el virus en un cultivo celular, la cepa de virus del dengue que se selecciona se utiliza para infectar la célula huésped (por ejemplo que se selecciona de entre los tipos celulares adecuados enumerados anteriormente). Tras la adsorción del virus, se alimentan los cultivos con un medio capaz de soportar el crecimiento de las células. Preferentemente, el medio no contiene suero ni proteínas derivadas del suero u otras proteínas derivadas de animales, o se puede utilizar un medio libre de suero para reemplazar el medio que contiene suero durante la producción. Hay disponibles muchas formulaciones de medio libre de suero en el mercado. Una descripción detallada de los procedimientos para producir virus en células mantenidas en condiciones libres de suero se puede encontrar, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de EE. UU publicada N° 20060183224, que se incorpora en el presente documento por referencia.

Las células huésped se mantienen en cultivo durante varios días hasta que se alcanza el título de virus deseado. Opcionalmente, las células se mantienen en un sistema de perfusión continua a partir del cual se pueden obtener los virus de manera intermitente o continua en el curso de varios días o más. En condiciones de cultivo no continuas, es deseable un título de virus de al menos aproximadamente 10^6 o 10^7 UFP/ml a los 3-7 días después de la infección. En algunas células huésped, el título se mantiene alto durante varios días, y el virus se puede recuperar en múltiples puntos de tiempo para maximizar el rendimiento. Por ejemplo, el virus se puede recolectar de estos cultivos diariamente, desde aproximadamente 3 a aproximadamente 13 días después de la infección recolectando los sobrenadantes y realimentando las células. Opcionalmente, los sobrenadantes se pueden agrupar antes del procesamiento adicional. En otras células huésped el virus se puede cultivar hasta un título más alto, pero en un periodo de tiempo más corto. En dicho caso, el virus se puede recolectar en un pico de título como se determine empíricamente.

Por ejemplo, se pueden amplificar las células Vero en medio VPSFM con Ficina hasta el pasaje 141. Se puede llevar a cabo un pasaje adicional en presencia de tripsina porcina. Las células se pueden sembrar a aproximadamente $0,7 \times 10^6$ células/ml en el Biorreactor (4 l) y cultivarse en microportadores (cytodex-1) durante 5 días en VPSFM + Pluronic al 0,1 % en condiciones de perfusión (por ejemplo, el D0 \rightarrow 0 volúmenes/día; D1 \rightarrow D2: 1 v/d durante los próximos 3 días). Las células a aproximadamente 3×10^6 células/ml se infectan entonces (a 35 °C) con virus del dengue, por ejemplo a una MOI de 0,01 en DMEM+Glutamina 4 mM + FBS al 2 % durante 2 h con un volumen reducido de medio (2 l) a 37 °C. El volumen del medio en el Biorreactor se ajusta entonces a 4 l. Después de 3 días, se retira una gran parte del medio (alrededor de 3 l) y se repone con medio DMEM+Glutamina 4 mM. A los 7 días después de la infección, se recolecta el virus.

Para recuperar el virus, se recolecta el virus por procedimientos comunes conocidos en la técnica que incluyen la centrifugación a baja velocidad (por ejemplo a 1500 x g durante 10 min), o por filtración mediante un filtro con un tamaño de poro de 0,45 μm . Los procedimientos para concentrar dichos virus están en el ámbito de un experto habituado en la técnica e incluyen, por ejemplo, la ultrafiltración (por ejemplo, con una membrana no mayor de 300 kDa de tamaño de poro), o la precipitación con polietilenglicol (PEG) 8000. Los procedimientos para purificar virus son conocidos por un experto habituado en la técnica e incluye los gradientes de sacarosa continuos o multi-etapa, la purificación por cromatografía en columna utilizando columnas de exclusión por tamaño, intercambio iónico, adsorción, o de afinidad, o purificación por partición en polímeros de sistemas de dos fases o multi-fase, y cualquier combinación de los mismos. Los procedimientos para ensayar las fracciones positivas de los virus incluyen el ensayo de placas, ensayo de hemoaglutinación (HA), y/o ensayos de antígenos tal como los inmunoensayos.

Por ejemplo, el virus del dengue se puede concentrar a partir del sobrenadante del cultivo por precipitación con polietilenglicol (PEG), los fluidos del sobrenadante de las células infectadas se clarifica por centrifugación (1.500 x g) durante 10 min. El sobrenadante clarificado se ajusta a un 6 % de PEG 8000 (Sigma) y 0,5 M de NaCl y se mantienen a 4 °C con un ligero agitado durante 45 min. El precipitado se recolecta por suspensión a 500 x g durante

50 min y se re-suspende en tampón STE (0,1 M de NaCl, 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA, pH 7,6). La suspensión vírica se puede clarificar por centrifugación (12.000 x g durante 10 min a 4 °C). El aglomerado se desechó, y el sobrenadante se centrifugó entonces (170.000 x g, 80 min, 4 °C) para aglomerar el virus. El aglomerado vírico se re-suspende en tampón STE a la concentración deseada.

5 De manera alternativa, o adicionalmente, el virus del dengue se puede concentrar a partir de los sobrenadantes por ultrafiltración de flujo tangencial. Los fluidos del sobrenadante de las células infectadas se clarifican por centrifugación a baja velocidad como se ha descrito anteriormente, entonces se filtra a través de un filtro CN de 0,45 mm (Nalgene). El sobrenadante filtrado se concentra mediante ultrafiltración de flujo tangencial utilizando una membrana de unión a proteínas inferiores con un corte de 100 kDa (por ejemplo, canal de pantalla omega 100 K, Filtron, Inc). La concentración se lleva a cabo a 4 °C utilizando un caudal de 400 ml por min, una velocidad de filtración de aproximadamente 100 ml por min y una presión de 20-30 psi.

10 Se puede conseguir una purificación adicional utilizando una ultracentrifugación en gradiente de sacarosa. El virus del dengue se puede purificar en gradientes de sacarosa esencialmente como se había descrito previamente (Srivastava y col. Arch. Virol. 96: 97-107, 1987) con mínimas modificaciones. Se puede fabricar gradientes de sacarosa de quince ml en tubos de ultracentrifugación de 40 ml (Ultra-clear. TM., Beckman Inc.) por la adición poco a poco de las siguientes soluciones de sacarosa p/p en solución salina tampón de fosfato, pH 7,4 (PBS, sin Ca ni Mg, Whittaker MA Bioproducts): 2 ml al 60 %, 2 ml al 55 %, 2 ml al 50 %, 2 ml al 45 %, 2 ml al 40 %, 2 ml al 35 %, 2 ml al 30 % y 1 ml al 15 %. Se forma un gradiente suave permitiendo que los tubos permanezcan durante 2-4 h a temperatura ambiente. Se aplican hasta 25 mm de virus concentrado en cada tubo. Entonces se lleva a cabo la ultracentrifugación (por ejemplo, en un rotor SW28 (Beckman) a 17.000 rpm durante 18 h a 4 °C). A continuación de la centrifugación, se pueden recolectar fracciones de 1 a 2 ml del fondo de los tubos. Las fracciones se pueden ensayar en cuanto a proteínas totales, virus HA, y antígeno vírico según se desee. Las fracciones de gradiente positivas se agrupan normalmente, y se diluyen hasta el 10 % o menos de sacarosa con el Medio 199 (M199, Gibco-BRL) o PBS. Opcionalmente, antes de la inactivación, los agrupamientos víricos se pueden filtrar a través de un filtro proteico inferior de 0,22 mm (tipo GV, Millipore).

15 A continuación de la purificación, los virus recuperados se inactivan por un medio seleccionado para conservar su antigenicidad e inmunogenicidad a la vez que se elimina su infectividad. En un ejemplo, se añade al virus una cantidad eficaz de un agente, tal como formalina o beta-propiolactona, y la mezcla se incuba con el agente inactivador hasta que se inactiva. Por ejemplo, se diluye formalina (con un 37 % de formaldehído) 1:40 en PBS, y se ajusta el pH a aproximadamente 7,4 con NaOH 1 N. La solución se esteriliza entonces por pasaje a través de un filtro CN de 0,22 mm (Nalgene). Esta solución de formalina se añade al virus purificado (1:50) para una concentración final de formalina del 0,05 %. La inactivación se lleva a cabo a entre 15 y 25 °C, durante 48 h hasta 14 días (normalmente, 10 días o menos). Opcionalmente, el virus se filtra a través de un filtro tipo GV de 0,22 um y se transfiere a un nuevo contenedor. Al terminar la inactivación, se neutraliza la formalina libre en la masa de cultivo, por ejemplo, por adición de una cantidad equimolar de un 10 % p/v de bisulfito sódico estéril.

20 De manera alternativa, se puede conseguir la inactivación radiando el virus con una fuente radioactiva hasta que el virus se inactiva. Un ejemplo favorable de una fuente radioactiva es el cobalto-60, a una dosis suficiente para inactivar la infectividad de los virus mientras se conserva la antigenicidad esencialmente intacta. Ejemplos de dosis útiles son las que se encuentran en el intervalo de desde 5,5 a 7,0 Mrads. Por ejemplo, se congelan alícuotas de virus de 50 ml en 1,5 ml de tubos de polipropileno estériles y se colocan en hielo seco en la celda gamma de una fuente de ⁶⁰Co, durante un periodo suficiente para suministrar la radiación deseada.

25 De manera alternativa, se puede emplear radiación ultravioleta para inactivar el virus del dengue. Los dispositivos adecuados para la radiación ultravioleta de virus en un contexto comercial son bien conocidos en la técnica, y los dispositivos están disponibles en el mercado, por ejemplo, en Bayer, que exponen el sobrenadante (u otro fluido que contiene el virus) a una fuente de luz UV-C a aproximadamente 254 nm, durante un tiempo suficiente para inactivar el virus mientras se conserva la inmunogenicidad.

De manera alternativa, el virus del dengue se puede inactivar utilizando peróxido de hidrógeno, por ejemplo, en la Solicitud de Patente de EE. UU. publicada N° 20070031451, que se incorpora en el presente documento por referencia.

30 Si se desea, se pueden emplear dos o más etapas de inactivación. Cuando se emplean dos o más etapas de inactivación, las etapas pueden ser las mismas o diferentes. Por ejemplo, una combinación de cualquier procedimiento de inactivación adecuado, tal como cualquiera de los procedimientos de inactivación precedentes, se pueden emplear durante la purificación e inactivación del virus del dengue para la formulación en una composición inmunogénica para la administración a un sujeto humano.

35 La calidad de la preparación del virus se puede controlar por una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Por ejemplo, se puede controlar el virus antes de la inactivación en un ensayo de titulación de placas. El virus se amplifica en la misma o una célula huésped diferente que se utiliza para la producción, y se utiliza para infectar una línea celular adecuada, tal como monocapas de células LLC-MK2 o células Vero, y se puede evaluar el número de placas víricas para determinar la infectividad del virus recuperado (véase, por ejemplo, Sukhavachana y

col. WHO Bull. 35: 65-6, 1966). Otro procedimiento para evaluar la cantidad y calidad del antígeno recuperado es por hemoaglutinación vírica (HA) y ensayos de inhibición de la hemoaglutinación (HI). Los ensayos de HA y HI vírica se puede llevar a cabo como se había descrito previamente (Clarke & Casals, Am. J. Trop. Med. Hyg. 7: 561-73, 1958). La proteína total se determina esencialmente como describió Bradford (Anal. Biochem. 72: 248, 1976), utilizando un kit disponible en el mercado (BioRad, Hercules, Calif.) y la seroalbúmina bovina (BSA) o gammaglobulina como referencias.

De manera alternativa el antígeno se puede detectar y/o cuantificar después de la inactivación, por ejemplo, en un ensayo de transferencia puntual de antígeno. Para detectar y cuantificar el antígeno en las preparaciones de virus inactivados, las muestras de virus se diluyeron en serie, normalmente por una dilución de dos veces, y se puntuó en papel de nitrocelulosa. Los papeles se secaron al aire, se bloquearon con un 5 % de caseína en PBS, y se incubaron con un anticuerpo específico o antisuero seguido por un anticuerpo secundario unido a una enzima. El virus se puede detectar también por transferencia de Western. En resumen, las preparaciones de antígeno se solubilizaron en tampón de muestra SDS-PAGE que contenía un 1 % de SDS, 66 mM de Tris-HCl, pH 6,8, un 1 % de glicerol y un 0,7 % de bromofenol azul a 22 °C durante 10 minutos y se hizo una electroforesis en geles de un 12,5 % de poli(acrilamida) (por ejemplo, como se describe en Feighny y col. Am. J. Trop. Med. Hyg. 50(3): 322-8, 1994). Las proteínas re-disueltas se transfirieron de manera electroforética a una membrana de nitrocelulosa o nilón. Las proteínas se pueden detectar entonces por tinción con oro coloidal y los antígenos víricos se pueden identificar inmunológicamente utilizando una modificación no isotópica del procedimiento de transferencia de Western.

COMPOSICIONES INMUNOGÉNICAS Y PROCEDIMIENTOS

El virus de dengue inactivado completo se mezcla con el adyuvante libre de aluminio para producir una composición inmunogénica adecuada para inmunizar sujetos humanos con el fin de dar lugar a títulos altos de anticuerpos neutralizantes del virus y proteger al ser humano inmunizado del a enfermedad producida por el virus del dengue. Normalmente, los virus de dengue inactivados completos se formulan en un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Los vehículos y excipientes farmacéuticamente aceptables se conocen bien y se pueden seleccionar por los expertos en la técnica. Por ejemplo, el vehículo o excipiente puede incluir favorablemente un tampón. Opcionalmente, el vehículo o excipiente puede contener también al menos un componente que estabiliza la solubilidad y/o estabilidad. Ejemplos de agentes solubilizantes/estabilizantes incluyen los detergentes, por ejemplo, la sarcosina de laurel y/o monooleato de polioxietileno sorbitán. Los agentes solubilizantes/estabilizantes alternativos incluyen arginina, y polioles formadores de cristales (tales como sacarosa, trealosa, y similares). Se conocen muchos vehículos farmacéuticamente aceptables y/o excipientes farmacéuticamente aceptables en la técnica y se describen, por ejemplo, en Remihgtoh's Pharmaceutical Sciences, por E. W. Martin, Mack Publishing Co., Easton, PA, 5ª Edición (975).

En consecuencia, se pueden seleccionar excipientes y vehículos adecuados por los expertos en la técnica para producir una formulación adecuada para el suministro a un sujeto por una vía de administración seleccionada.

Los excipientes adecuados incluyen sin limitación: glicerol, polietilenglicol (PEG), sorbitol, trealosa, sal sódica de la N-lauroilsarcosina, L-prolina, sulfobetaína no detergente, hidrocloreuro de guanidina, urea, óxido de trimetilamina, KCl, Ca²⁺, Mg²⁺, Mn²⁺, Zn²⁺ y otras sales relacionadas con cationes divalentes, ditiotreitól, ditioeritrol y β-mercaptoetanol. Otros excipientes pueden ser detergentes (incluyendo: monooleato de polioxietileno sorbitán, Triton X-100, NP-40, Empigen BB, Octilglucósido, lauroil maltósido, Zwittergente 3-0, Zwittergente 3-2, Zwittergente 3-4, Zwittergente 3-6, CHAPS, desoxicolato sódico, dodecil sulfato sódico, bromuro de cetiltrimetilamonio).

Las composiciones inmunogénicas desveladas en el presente documento también incluyen un adyuvante. En el contexto de una composición inmunogénica adecuada para la administración a un sujeto con el fin de dar lugar a una respuesta inmunitaria protectora contra el dengue, el adyuvante es una adyuvante libre de aluminio, en el que el adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y monooleato de polioxietileno sorbitán, y en el que la emulsión de aceite en agua no contiene ningún inmunoestimulante adicional.

El vehículo acuoso puede ser por ejemplo, solución salina tampón de fosfato.

Una composición inmunogénica contiene normalmente una cantidad inmunoprotectora (o una fracción de la dosis de la misma) del antígeno y se puede preparar por técnicas convencionales. La preparación de composiciones inmunogénicas, incluyendo las que se administran a sujetos humanos, se describen en general en Pharmaceutical Biotechnology, Vol. 61 Vaccine Design-the subunit and adjuvant approach, editado por Powell y Newman, Plenum Press, 1995. New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller y col., University Park Press, Baltimore, Maryland, U.S.A. 1978. La encapsulación en liposomas se describe, por ejemplo, por Fullerton, Patente de EE. UU. 4.235.877. La conjugación de proteínas a macromoléculas se desvela, por ejemplo, por Likhite, Patente de EE. UU. 4.372.945 y por Armor y col., Patente de EE. UU. 4.474.757.

Normalmente, la cantidad de antígeno de cada dosis de la composición inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta inmunoprotectora sin efectos adversos significativos en el sujeto típico. Inmunoprotector en este contexto no significa necesariamente completamente protector contra la infección; significa

protección contra los síntomas de la enfermedad, especialmente de la enfermedad asociada con el virus. La cantidad de antígeno puede variar dependiendo del inmunógeno específico que se emplee. En general, se espera que cada dosis para un ser humano comprenderá 0,05-100 µg de virus inactivado, tal como desde aproximadamente 0,1 µg (por ejemplo, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4 o 0,5 µg) a aproximadamente 50 µg, por ejemplo, desde aproximadamente 0,5 µg a aproximadamente 30 µg, tal como aproximadamente 1 µg, aproximadamente 2 µg, aproximadamente 3 µg, aproximadamente 4 µg, aproximadamente 5 µg, aproximadamente 10 µg, aproximadamente 15 µg, aproximadamente 20 µg, o aproximadamente 25 µg, de cada cepa de virus del dengue inactivado. La cantidad utilizada en una composición inmunogénica se selecciona basándose en la población del sujeto (por ejemplo, niños). Una cantidad óptima para una composición particular se puede establecer por estudios convencionales que implican la observación de los títulos de anticuerpo y otras respuestas en los sujetos. Después de una vacunación inicial, los sujetos pueden recibir un refuerzo tras un intervalo adecuado (por ejemplo, en aproximadamente 4 semanas).

Se debería señalar que independientemente del adyuvante seleccionado, la concentración de la formulación final se calcula para ser segura y eficaz en la población diana. Por ejemplo, las composiciones inmunogénicas para dar lugar a una respuesta inmunitaria contra el virus del dengue en seres humanos se administran favorablemente en niños (por ejemplo, en niños entre el nacimiento y 1 año, tal como entre 0 y 6 meses, a la edad de la dosis inicial). Las composiciones inmunogénicas para dar lugar a una respuesta inmunitaria contra el dengue también se administran favorablemente a seres humanos adultos (por ejemplo, solas o en combinación con antígenos de otros agentes patógenos, por ejemplo, en el contexto de las vacunas del "viajero"). Se apreciara que la elección del adyuvante puede ser diferente en estas aplicaciones diferentes, y que el adyuvante óptimo y su concentración para cada situación se determinarán empíricamente por los expertos en la técnica.

Normalmente, las vacunas se preparan como inyectables, sea como soluciones o suspensiones líquidas; también se pueden preparar en forma sólida adecuada para hacer una solución o suspensión en un líquido antes de la inyección. Aunque la composición se puede administrar por una variedad de diferentes vías, más comúnmente, las composiciones inmunogénicas se suministran por una vía de administración intramuscular, subcutánea o intradérmica. En general, la vacuna se puede administrar por vía subcutánea, intradérmica, o intramuscular en una dosis eficaz para la producción de anticuerpos neutralizantes y la protección. Las vacunas se administran de una manera compatible con la formulación de dosificación, y en una cantidad tal que sea eficaz profiláctica y/o terapéuticamente. La cantidad que se va a administrar, es está en general en el intervalo de 0,05-100 µg de cada cepa de virus inactivado por dosis, depende del sujeto que se va a tratar, la capacidad del sistema inmunitario del sujeto para sintetizar anticuerpos, y el grado de protección deseada. Las cantidades de vacuna precisas que se va a administrar pueden depender del juicio del médico y puede ser peculiar para cada sujeto.

La vacuna se puede dar en un programa de dosis única, o preferentemente en una programación de dosis múltiple en el que un primer curso de vacunación puede ser con 1-10 dosis separadas, seguidas por otras dosis que se dan en intervalos de tiempo posteriores necesarios para mantener y/o reforzar la respuesta inmunitaria, por ejemplo, a los 1-4 meses de una segunda dosis, y si fuera necesario, dosis posteriores después de varios meses o años. El régimen de dosificación también se determinará, al menos en parte, por las necesidades del individuo y dependerá del juicio del médico. Ejemplos de programaciones adecuadas de inmunización incluyen: una primera dosis, seguida por una segunda dosis entre 7 días y 6 meses, y una tercera dosis opcional entre 1 mes y dos años después de la inmunización inicial, u otras programaciones suficientes para dar lugar a títulos de anticuerpos neutralizantes del virus que se espera que confieran una inmunidad protectora, por ejemplo que se seleccionan para que correspondan con un calendario vacunal pediátrico establecido. Puede esperarse razonablemente la generación de una inmunidad protectora contra el dengue con una vacuna de virus inactivado tras un curso primario de inmunización que consiste en 1 a 3 inoculaciones. Estas se podrían suplementar por refuerzos a intervalos (por ejemplo, cada dos años) diseñados para mantener un nivel satisfactorio de inmunidad protectora.

Ejemplos

Ejemplo I – Inmunogenicidad de composiciones inmunogénicas ejemplares que contienen virus del dengue inactivados purificados (1 µg y 10 µg) y un adyuvante libre de aluminio

Se vacunaron por vía intramuscular grupos de 15 ratones C57B1/6 hembras adultas intactas con dos dosis de un candidato vacunal ejemplar que contenía virus inactivado purificado (PIV) de una cepa Dengue-2 (Den-2). La vacuna se administró con un volumen total de 50 µl. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contenían PIV del dengue solo o formulaciones que contenían una vacuna PIV del dengue adyuvantada con aluminio (hidróxido de aluminio), monofosforil lípido A 3-Desacetilado (3D-MPL) adsorbido en hidróxido de aluminio (AS04D), una emulsión de aceite en agua (AS03A) y 3D-MPL y QS21 en una formulación liposómica (AS01B) (véase los grupos en la Tabla 1 posterior). AS03A y AS01B eran dos ejemplos no limitantes de adyuvantes libres de aluminio (alum). El antígeno PIV del dengue se utilizó para la formulación era un volumen purificado obtenido esencialmente como se describe en el presente documento a partir de un cultivo de virus Den-2 tipo silvestre, inactivado con 0,185 % de formalina durante 7 días a 22 °C.

A lo largo de los ejemplos descritos en el presente documento, se llevaron a cabo análisis estadísticos sobre la frecuencia de CD4+ después de la vacunación y los títulos neutralizantes por UNISTAT. El protocolo aplicado para el análisis de la varianza se puede describir brevemente de la siguiente manera: □ transformación log de los datos;

ensayo Shapiro-Wilk de cada población (grupo) con el fin de verificar la normalidad de la distribución de los grupos; ensayo de Cochran con el fin de verificar la homogeneidad de la varianza entre las diferentes poblaciones (grupos); Análisis de la varianza en los datos seleccionados; ensayo para la interacción de ANOVA de una vía; Ensayo de Tukey-HSD para las comparaciones múltiples.

5

Tabla 1

Gr	Antígeno / Formulación	PIV Den-2 (Conc Total prot/dosis)	Otro tratamiento
1	PIV Den-2 normal (no-adyuvantado)	10 µg	Días 0 y 21
2	PIV Den-2 + AS22A (Al(OH)3)	10 µg	Días 0 y 21
3	PIV Den-2 + AS04D	10 µg	Días 0 y 21
4	PIV Den-2 + AS03A	10 µg	Días 0 y 21
5	PIV Den-2 + AS01B	10 µg	Días 0 y 21
6	PIV Den-2 + normal (no-adyuvantado)	1 µg	Días 0 y 21
7	PIV Den-2 + AS22A (Al(OH)3)	1 µg	Días 0 y 21
8	PIV Den-2 + AS04D	1 µg	Días 0 y 21
9	PIV Den-2 + AS03A	1 µg	Días 0 y 21
10	PIV Den-2 + AS01B	1 µg	Días 0 y 21
11	PBS		Días 0 y 21

La respuesta inmunitaria humoral se midió 21 días después de la primera inmunización (fijado como Día 0) y la segunda inmunización (Día 21), es decir, los días 21 y 42, después de la inmunización. Se ensayaron las muestras de suero utilizando un ensayo de neutralización anti-dengue. En resumen, para medir los títulos neutralizantes en el suero del ratón contra el virus del dengue, se incubaron diluciones en serie de suero inactivado por calor y filtrado con una cantidad fija de virus del dengue mono-específico (Dengue-2). Entonces se añadió la mezcla de suero y virus a una monocapa de células Vero (de un banco celular de la OMS) y se incubó durante 4 días. Se midió la inhibición de la infección vírica por las muestras de suero utilizando un ELISA que detecta los antígenos víricos asociados a las células en las células Vero adheridas a una microplaca de 96 pocillos. Las lecturas de densidad óptica resultantes se procesaron automáticamente en una hoja de cálculo de Excel que utiliza un modelo de programa de regresión lineal del punto medio log para derivar un porcentaje de la reducción vírica de infección (al que se hace referencia como reducción del 50 por ciento de microneutralización, o MN50). El título de neutralización del virus (MN50) se define como el recíproco de la dilución de suero que da un 50 % de reducción en la lectura de la absorbancia del ensayo cuando se compara con la dosis de virus de control sin suero (TV).

Los títulos de anticuerpos neutralizantes se determinaron en los sueros agrupados de cada grupo el día 21, y en sueros individuales el día 42. Los resultados se ilustran en la FIG. 1. El mismo perfil inmunológico se observó con las dos dosis ensayadas (1 y 10 µg de proteína total). Los títulos de anticuerpos neutralizantes estaban aumentados después de dos administraciones de 1 µg o 10 µg de la vacuna PIV de dengue en comparación con la respuesta después de una única dosis de la composición. Para ambas dosis de la vacuna PIV de dengue, se observaron respuestas de anticuerpo neutralizantes significativamente menores con la vacuna no adyuvantada en comparación con la vacuna de PIV de dengue adyuvantada ($p < 0,00001$). Con la dosis de 10 µg de proteína total, la vacuna PIV de dengue adyuvantada con AS04D inducía una respuesta de anticuerpos neutralizantes significativamente mayor en comparación con la respuesta inducida por la vacuna PIV de dengue adyuvantada con aluminio solo (AS22A) ($p = 0,0027$). No se observó diferencia entre estos dos adyuvantes a la dosis de 1 µg de proteína total ($p > 0,05$). Como se muestra en la FIG. 1, las composiciones adyuvantadas con un adyuvante libre de aluminio inducía respuestas de anticuerpo neutralizante más altas (AS03A ($p < 0,0173$) o AS01B ($p < 0,0001$)) que las composiciones con AS04D o AS22A. La vacuna PIV de dengue adyuvantada con AS03A y AS01B inducía niveles similares de títulos de anticuerpo neutralizante ($p > 0,05$).

Estos resultados demuestran que con una dosis de 1 o 10 µg de proteína total de PIV de dengue, se observaban títulos de anticuerpo neutralizante más altos en ratones inmunizados con composiciones que contenían un sistema adyuvante que no contiene aluminio (como se ejemplifica con AS03A o AS01B mostrados en el presente documento) en comparación con la respuesta inducida por el mismo antígeno en combinación con un adyuvante que contenía aluminio (por ejemplo, AS22A o AS04D).

Ejemplo II – Inmunogenicidad de composiciones inmunogénicas ejemplares que contienen un virus inactivado purificado del dengue (1 µg y 10 µg) y un adyuvante libre de aluminio con diferentes diluciones de adyuvante

Se administraron a grupos de 15 ratones C57B1/6 hembras adultas dos dosis de la vacuna ejemplar PIV de dengue por vía intramuscular con un volumen total de 50 ml. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contenían el PIV de dengue solo o formulaciones que contenían el antígeno PIV de dengue adyuvantado con Aluminio (AS22A, hidróxido de aluminio), o la dilución de diferentes sistemas de adyuvante, por ejemplo, tal como 1/2 dosis convencional de AS04D (AS04D/2), AS03B (sistema Adyuvante basado en una emulsión de aceite en agua que contenía 5,93 mg de tocoferol), y AS01E (media dosis de AS01B) (detallado en la Tabla 2). El PIV utilizado para la formulación era un volumen purificado de un cultivo de un virus Den-2 de tipo silvestre, inactivado con un 0,185 % de formalina durante 7 días a 22 °C.

Tabla 2

Gr	Antígeno / Formulación	PIV Den-2 Conc Total prot/ratón	Otro tratamiento
1	PIV Den-2 normal (no-adyuvantado)	1 µg	Días 0 y 21
2	PIV Den-2 + AS22A (Al(OH) ₃)	1 µg	Días 0 y 21
5	PIV Den-2 + AS04D/2	10 µg	Días 0 y 21
6	PIV Den-2 + AS03B	10 µg	Días 0 y 21
7	PIV Den-2 + AS01E	10 µg	Días 0 y 21
8	PIV Den-2 + AS04D/2	1 µg	Días 0 y 21
9	PIV Den-2 + AS03B	1 µg	Días 0 y 21
10	PIV Den-2 + AS01E	1 µg	Días 0 y 21
11	PBS		Días 0 y 21

La respuesta inmunitaria humoral a la inmunización se midió 21 días después de la primera y segunda inmunizaciones (Días 21 y 42, respectivamente) en los 15 ratones/grupo. Las muestras de suero se ensayaron por el ensayo de neutralización descrito anteriormente.

Los títulos de anticuerpos neutralizantes en los sueros agrupados por grupos el día 21, y en sueros individuales por grupos el día 42, se presentan en la FIG. 2. Se observó el mismo perfil inmunológico en ambas dosis ensayadas (1 y 10 µg de proteína total). Se observaron títulos de anticuerpos neutralizantes mayores después de dos administraciones de la composición inmunogénica en comparación con la respuesta inducida después de solo una única administración de 1 µg o 10 µg de antígeno PIV de dengue. Para ambas dosis de la vacuna PIV de dengue ensayadas, se observaron respuestas de anticuerpos neutralizantes menores con la vacuna no adyuvantada en comparación con las formulaciones de PIV de dengue adyuvantadas ($p < 0,00001$). A la dosis de 1 µg de proteína total, vacuna PIV de dengue adyuvantada con AS04D/2 inducía una respuesta de anticuerpos neutralizantes similar en comparación con la respuesta inducida por la vacuna de PIV de dengue adyuvantada con aluminio solo ($p > 0,05$). Para la misma dosis de vacuna ensayada, la vacuna de PIV de dengue adyuvantada con AS03B o AS01E inducía títulos de anticuerpos neutralizantes más altos en comparación con la vacuna adyuvantada con AS04D ($p \leq 0,029$ para AS03B y $p \leq 0,00001$ para AS01E) o aluminio ($p \leq 0,0035$ para AS03B y $p \leq 0,00001$ para AS01E).

En conclusión, a una dosis de 1 o 10 µg de proteína total de antígeno de PIV del dengue, se observaron títulos de anticuerpos neutralizantes más altos en ratones inmunizados con las composiciones adyuvantadas con una dilución del sistema adyuvante que no contiene aluminio (AS03B o AS01E) en comparación con la respuesta inducida por el mismo antígeno adyuvantado con un adyuvante que contiene aluminio (AS22A o AS04D/2).

Ejemplo III – Inmunogenicidad de composiciones inmunogénicas ejemplares que contienen un virus del dengue inactivado purificado (2 µg y 200 ng) y una adyuvante libre de aluminio a diferentes diluciones de adyuvante

Se inmunizaron grupos de 25 ratones C57B1/6 hembras adultas por vía intramuscular con dos dosis de una vacuna de PIV de dengue ejemplar en un volumen total de 50 ml. Los ratones se inmunizaron con formulaciones que contenían antígeno de PIV de dengue solo o formulaciones que contenían el antígeno de PIV de dengue adyuvantadas con Aluminio (AS22A, hidróxido de aluminio) o las diluciones de diferentes adyuvantes, por ejemplo, AS04D (AS04D/2), AS03B (sistema de adyuvante basado en una emulsión de aceite en agua que contenía 5,93 mg de tocoferol), y AS01E (media dosis de AS01B) (los grupos se detallan en la Tabla 3). El antígeno PIV utilizado para la formulación era un volumen purificado obtenido de un cultivo de virus Den-2 de tipo silvestre, inactivado con un 0,185 % de formalina durante 7 días a 22 °C.

Tabla 3

Gr	Antígeno / Formulación	PIV Den-2 Conc Total prot/ratón	Otro tratamiento
1	PIV Den-2 normal (no-adyuvantado)	200 ng	Días 0 y 14
2	PIV Den-2 + AS22A (Al(OH) ₃)	200 ng	Días 0 y 14
3	PIV Den-2 + AS04D/2	2 µg	Días 0 y 14
4	PIV Den-2 + AS03B	2 µg	Días 0 y 14
5	PIV Den-2 + AS01E	2 µg	Días 0 y 14
6	PIV Den-2 + AS04D/2	200 ng	Días 0 y 14
7	PIV Den-2 + AS03B	200 ng	Días 0 y 14
8	PIV Den-2 + AS01E	200 ng	Días 0 y 14
9	PBS		Días 0 y 14

5 La respuesta inmunitaria humoral a la administración de la composición inmunogénica se midió 14 días después de la primera y segunda inmunizaciones (Días 14 y 28, respectivamente) en los 15 ratones/grupo. Las muestras de suero se evaluaron por el ensayo de neutralización descrito anteriormente.

10 Se sacrificaron diez ratones de cada grupo a los 7 días después de la inmunización con el fin de evaluar la respuesta inmunitaria celular por ICS utilizando 5 agrupamientos de 2 bazos cada uno. El CMI solo se evaluó en los grupos de ratones inmunizados con 2 µg de vacuna de PIV del dengue adyuvantada con AS04D/2, AS03B, AS01E y en ratones inmunizados con 200 ng de la vacuna no adyuvantada o la vacuna adyuvantada con AS22A (grupos 1 a 5) y los ratones que recibían PBS (grupo 9). Los sueros de otros 15 ratones se recolectaron 14 días después de la primer inmunización (día 14) y la segunda inmunización (día 28).

15 Se determinaron los títulos de anticuerpos neutralizantes en los sueros agrupados por grupos el día 14, y en suero individuales por grupo en el día 28. Los resultados se proporcionan en la FIG. 3. Se observaron títulos de anticuerpos neutralizantes más altos después de dos administraciones de 2 µg o 200 ng de vacuna de PIV del dengue en comparación con los títulos después de una única administración. Se observaron respuesta de anticuerpos neutralizantes significativamente más altos con las formulaciones de PIV de dengue adyuvantadas en comparación con la formulación no adyuvantada ($p < 0,0089$). A la dosis de 200 ng de PIV de dengue, las formulaciones adyuvantadas con AS03B y AS01E daban lugar a una respuesta de anticuerpos neutralizantes sustancialmente mayor en comparación con la respuesta que da lugar el mismo antígeno formulado con AS22A o AS04D/2. A la dosis menor de antígeno, el PIV de dengue adyuvantado con AS22A y AS04D/2 inducía una respuesta de anticuerpos neutralizantes comparable a la dosis de 200 ng de proteína total ($p > 0,05$). A la dosis de antígeno más alta de 2 µg de proteína total, la formulación con AS04D/2 inducía una respuesta de anticuerpos neutralizantes en comparación con la vacuna adyuvantada con AS03B ($p > 0,05$). Sin embargo, a la dosis menor de antígeno (200 ng), la formulación con AS03B daba lugar a títulos de anticuerpos neutralizantes más altos que con AS04D/2 ($p = 0,0012$). De manera interesante, el PIV de dengue adyuvantado con AS01E inducía títulos de anticuerpos neutralizantes significativamente más altos en comparación con el resto de grupos ($p \leq 0,0028$).

25 La respuesta inmunitaria celular también se evaluó después de dos administraciones de PIV de dengue en combinación con las diluciones de adyuvante mencionadas anteriormente. Se evaluaron las respuestas de citocinas de linfocitos T CD4+ 7 días después de la segunda inmunización (Día 21) por ICS (FIG. 4).

30 Se inducía una respuesta de linfocitos T CD4+ menor por la vacuna de PIV de dengue no adyuvantada en comparación con el resto de grupos ($p \leq 0,001$). Los ratones inmunizados con la vacuna de PIV de dengue adyuvantada con AS01E inducía las respuestas más altas de linfocitos T CD4+ en comparación con los ratones del resto de grupos ($p \leq 0,00001$). La respuesta de linfocitos T CD4+ obtenida con la vacuna de PIV de dengue adyuvantada con AS22A, AS04D/2 y AS03B no eran estadísticamente diferentes ($p > 0,05$).

35 En conclusión, se observaron títulos de anticuerpos neutralizantes más altos en ratones inmunizados con la vacuna PIV de dengue adyuvantada con un sistema de adyuvante que no contenía aluminio (AS03B o AS01E) en comparación con la respuesta inducida por esta vacuna adyuvantada con hidróxido de aluminio (AS22A). Hay que señalar que la vacuna de PIV de dengue adyuvantada con AS01E inducía una respuesta de anticuerpos neutralizantes más alta y una respuesta de linfocitos T CD4 más alta en comparación con la vacuna adyuvantada con el adyuvante que contenía aluminio, AS04D/2.

40 En resumen, en comparación con los ratones inmunizados con el PIV de dengue formulado con adyuvantes que contienen aluminio (AS22A, AS04D, o AS04D/2), los ratones inmunizados con una vacuna formulada con sistemas de adyuvante libres de aluminio (por ejemplo, AS01B o AS01E, que no contenían aluminio), daban lugar a una

respuesta de anticuerpos neutralizantes y respuesta de linfocitos T CD4+ mayores. Estos resultados demuestran los atributos inmunogénicos favorables de las vacunas de PIV de dengue formuladas con adyuvantes libres de aluminio.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una composición inmunogénica para su uso en la administración a un ser humano que comprende al menos un virus del dengue inactivado completo y un adyuvante libre de aluminio, en el que el adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y monooleato de polioxietileno sorbitán, y en el que la emulsión de aceite en agua no contiene ningún inmunoestimulante adicional.
2. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que al menos un virus de dengue inactivado completo se selecciona de entre el grupo que consiste en un virus Dengue-1, un virus Dengue-2, un virus Dengue-3 y un virus Dengue-4.
- 10 3. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en la que al menos un virus de dengue inactivado completo es un virus Dengue-2.
4. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-3, que comprende escualeno y alfa tocoferol en una relación que es igual a, o menor que, 1.
- 15 5. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en la que el adyuvante se formula en una dosis que comprende:
- desde aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 10 % de escualeno,
desde aproximadamente un 2 % a aproximadamente un 10 % de alfa-tocoferol,
desde aproximadamente un 0,3 % a aproximadamente un 3 % de monooleato de polioxietileno sorbitán.
- 20 6. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5, en la que el adyuvante se formula en una dosis que comprende:
- desde aproximadamente 10 mg a aproximadamente 12 mg de escualeno,
desde aproximadamente 10 mg a aproximadamente 12 mg de alfa-tocoferol,
desde aproximadamente 4 mg a aproximadamente 6 mg de monooleato de polioxietileno sorbitán.
- 25 7. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 5 o 6, en la que el adyuvante se formula en una dosis que comprende:
- 10,68 mg de escualeno,
11,86 mg de tocoferol,
4,85 mg de monooleato de polioxietileno sorbitán.
- 30 8. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 7, en la que el adyuvante se formula en una fracción de la dosis.
9. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en el que la composición inmunogénica comprende un virus Dengue-1, un virus Dengue-2, un virus Dengue-3 y un virus Dengue-4.
- 35 10. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que dicha composición inmunogénica es una composición vacunal contra el dengue.
11. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10 para su uso en la prevención, mejora o tratamiento de la enfermedad producida por el virus del dengue en un sujeto.
12. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho sujeto es menor de cinco años de edad.
- 40 13. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con la reivindicación 11, en la que dicho sujeto es menor de un año de edad.
14. La composición inmunogénica para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 11, 12 o 13, en la que dicha enfermedad producida por el virus del dengue es la fiebre hemorrágica (DHF) o el síndrome de choque por dengue (DSS).
- 45 15. Un procedimiento de producción de una vacuna de dengue para su uso en la administración a un ser humano que comprende:
- proporcionar al menos un virus de dengue inactivado completo purificado; y
formular el al menos un virus de dengue inactivado completo purificado con un adyuvante libre de aluminio, en el que el adyuvante es una emulsión de aceite en agua que comprende escualeno, alfa-tocoferol y monooleato de polioxietileno sorbitán y en el que la emulsión de aceite en agua no contiene ningún inmunoestimulante adicional.
- 50

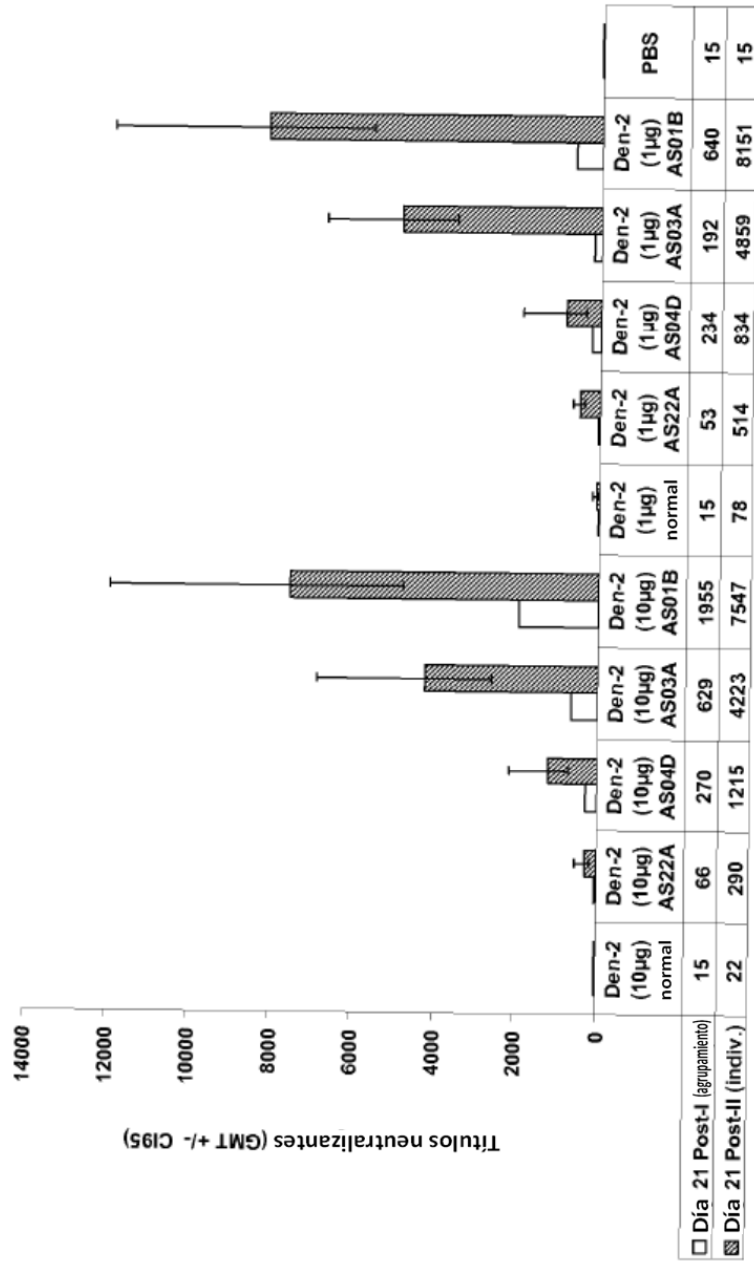


FIG. 1

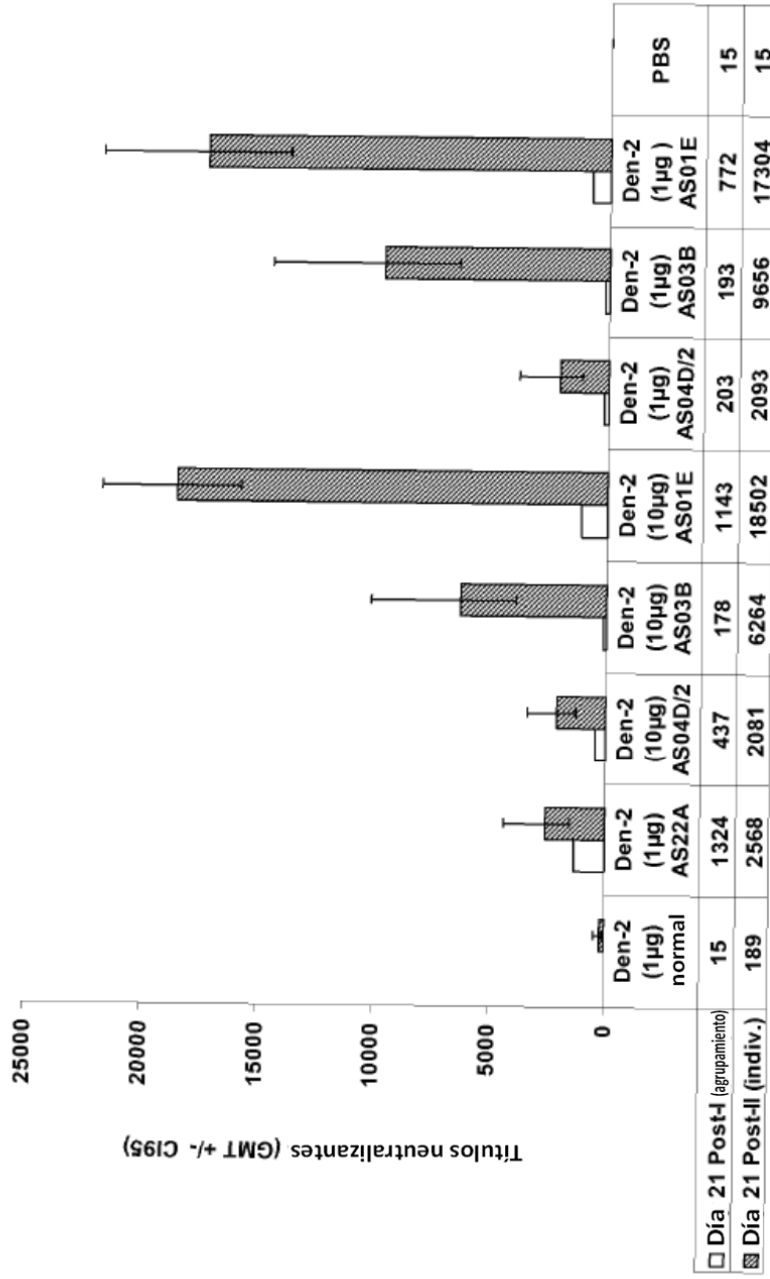


FIG. 2

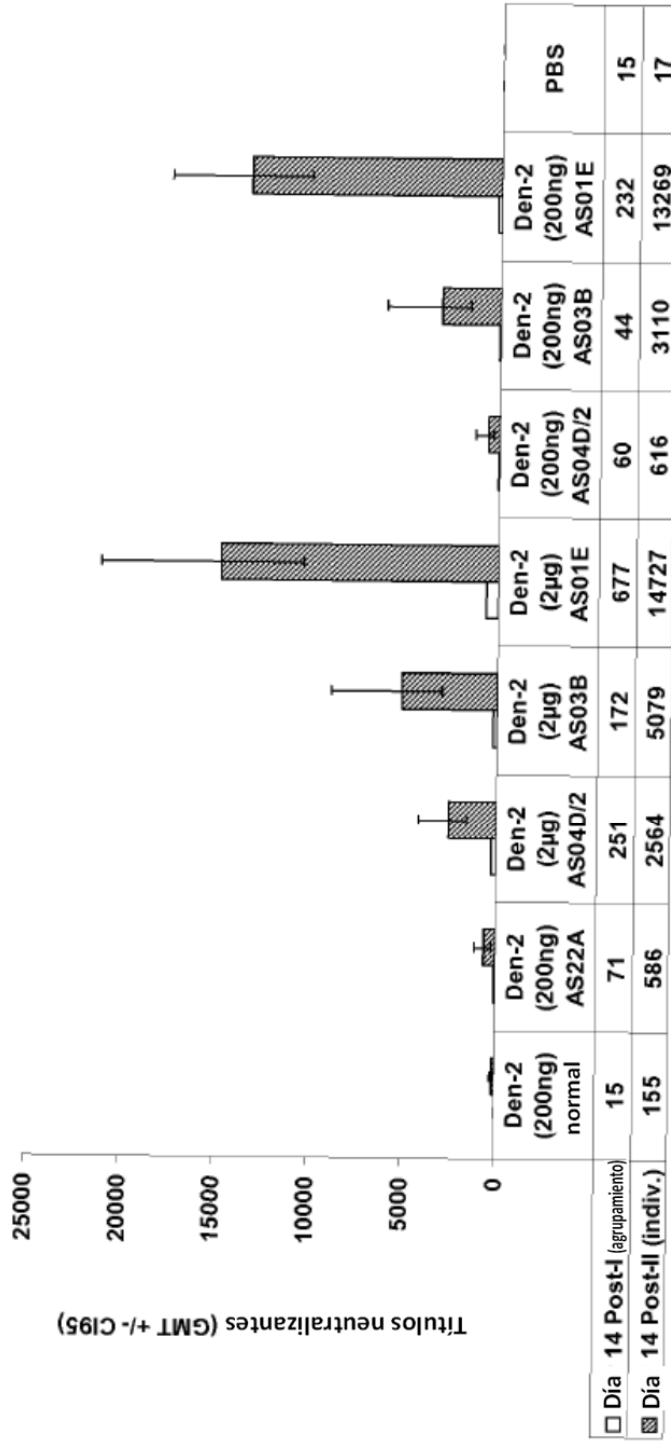


FIG. 3

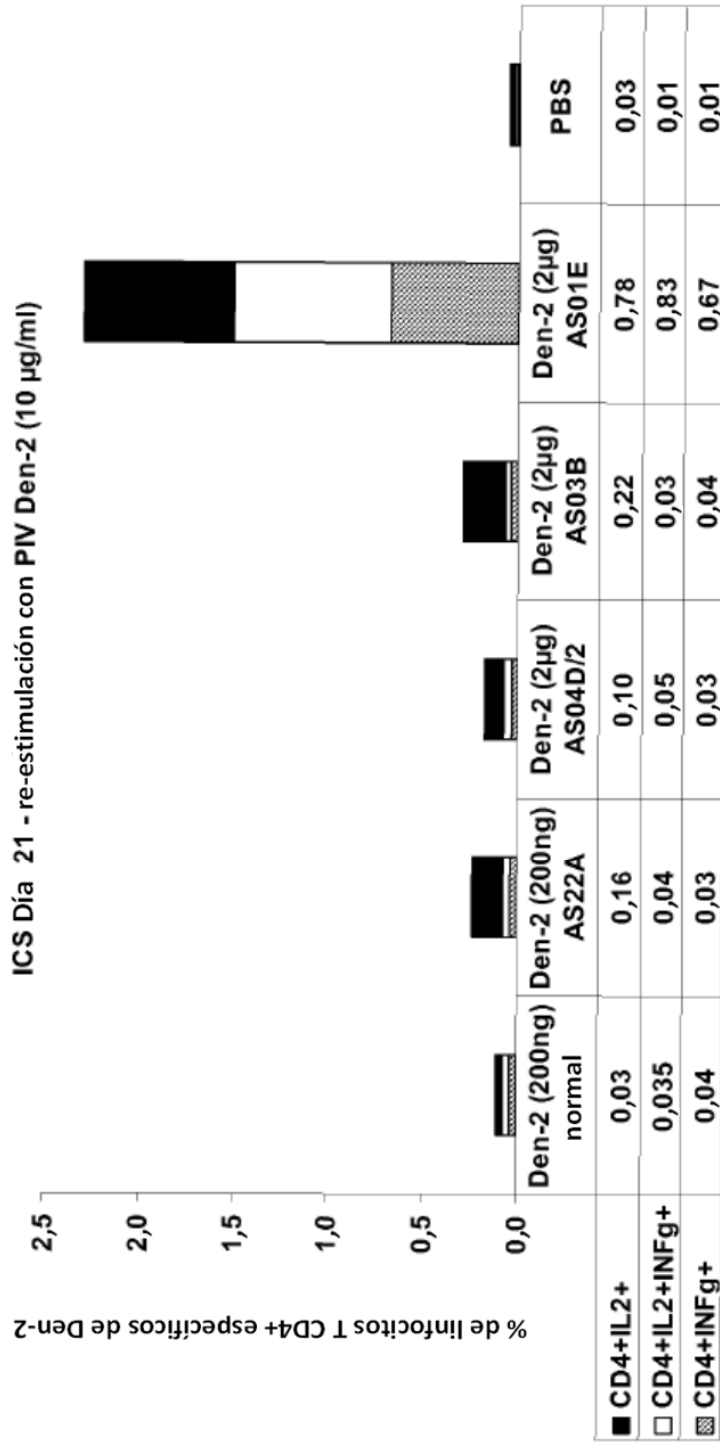


FIG. 4.