



No. 13-019546- -00000-0000

Fecha: 2013-02-01 17:01:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

DELEGATURA DE PROPIEDAD INDUSTRIAL
DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES

SOLICITUD DE PATENTE DE
INVENCION

TITULO: VACUNAS DE VIRUS VARICELA ZÓSTER INACTIVADO, MÉTODOS
DE PRODUCCIÓN Y USO DE LAS MISMAS.

SOLICITANTE: MERCK SHARP & DOHME CORP.

DIRECCIÓN: 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907
E.U.A.

APODERADO: CARLOS R. OLARTE

BOGOTÁ 01 de Febrero de 2013

P2013/000022



No. 13-019546- -00000-0000

Fecha: 2013-02-01 17:01:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Evg: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

PETITORIO - FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD

PATENTE PCT

ENTRADA EN FASE NACIONAL

P2013/000022

SOLICITUD DE:

1

☒

Patente de Invención.

☐

Patente de Modelo de Utilidad.

☒

Capítulo I.

☐

Capítulo II.

2

SOLICITANTE
(71)Nombre: **MERCK SHARP & DOHME CORP.**Dirección: 126 East Lincoln Avenue, Rahway,
New Jersey 07065-0907. Estados Unidos de
América

Nacionalidad o Domicilio: Estadounidense

Lugar de Constitución: Estados Unidos de
América.

Teléfono: _____

Fax: _____

E-mail: _____

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☐ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

REPRESENTANTE
O APODERADONombre: CARLOS R. OLARTEDirección: Carrera 5 No. 34-03

Teléfono: 601-7700 Fax: 601-7799

E-mail: office@olartemoure.com

IDENTIFICACIÓN

C.C. ☒ NIT ☐C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 79.782.747 Btá
TP 74.295INVENTOR (ES)
(72)Nombre: VER PAGINA ADJUNTADirección: VER PAGINA ADJUNTANacionalidad o Domicilio: VER PAGINA ADJUNTA

5

PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/US2011/046534Fecha Agosto 04, 2011Publicación Internacional No. WO 2012/018973 A1Fecha Febrero 09, 2012

6

Título (54) VACUNAS DE VIRUS VARICELA ZÓSTER INACTIVADO, MÉTODOS DE PRODUCCIÓN Y USO DE LAS MISMAS.**Clasificación Internacional (51)** A61K 39/25, A61K 39/245; A61K 39/275; A61K 39/285; C12N 7/04.

Prioridad

SI

☒

NO

☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

Agosto 05, 2010

(31) Número de Solicitud

61/371,038

9

Comprobante de pago No. 13-

Fecha _____

10

ANEXOS☒

Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.

☒

Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.

☒

Poderes, si fuere el caso.

☐

Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.

☐

Declaraciones. Bajo la Regla 4.17 (ii) del PCT.

☒

Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☒

Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos).

☐

Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA). (IPRP)

☐

Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA.

☐

De ser el caso, copia del contrato de acceso.

☐

De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.

☐

De ser el caso, certificado de depósito del material biológico.

☐

Arte final 12 x 12.

☐

De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.

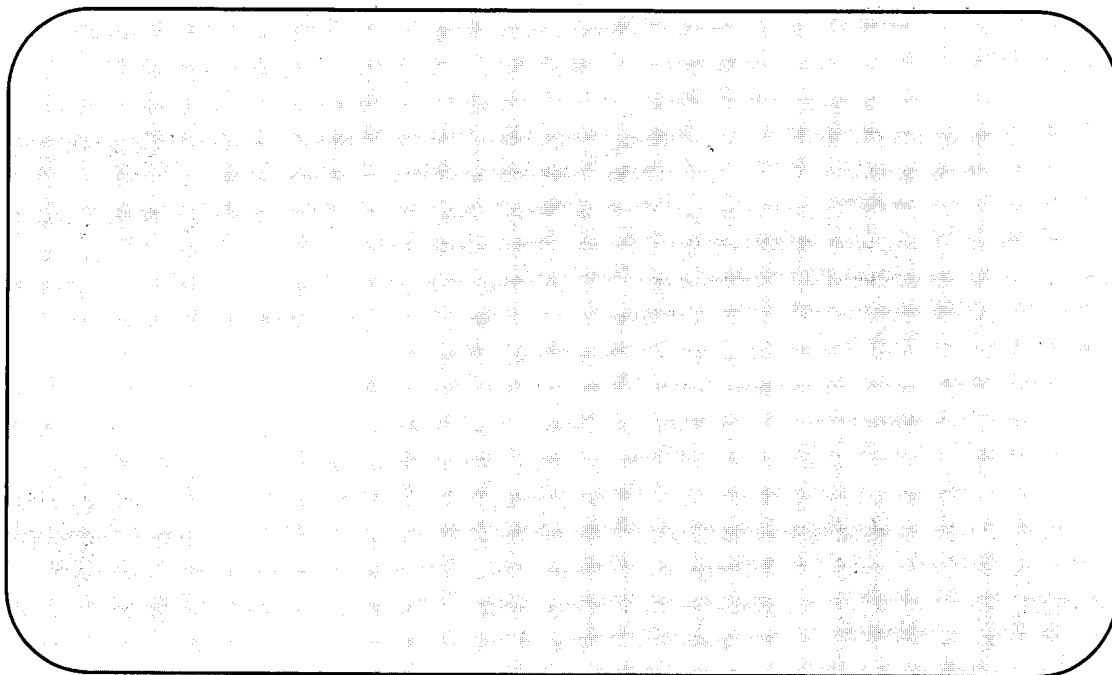
☐

De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.

☒

Otros. Búsqueda Internacional.

11

FIGURA CARACTERÍSTICA:

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: CARLOS R. OLARTE

FIRMA:

C.C. 79.782.747 Btā T.P. 74.295

LISTA DE INVENTORES**PCT/US2011/046534****David L. KRAH**

770 Sumneytown Pike,
West Point, PA 19486,
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: India

Jill DEHAVEN

2241 Oak Terrace, Lansdale,
Pennsylvania 19446
Estados Unidos de América
Nacionalidad: Estadounidense

Jennifer A. KRISS

770 Sumneytown Pike,
West Point, PA 19486,
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

Colleen M. BARR

770 Sumneytown Pike,
West Point, PA 19486,
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

Mary YAGODICH

770 Sumneytown Pike,
West Point, PA 19486,
Estados Unidos de América.
Nacionalidad: Estadounidense

4

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO NIT : 800.176.089-2 - / -					
 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	RECIBO DE CAJA			No. 13 - 003044	
				Bogotá D.C., Enero 14 de 2013 - 09:56:54	
RECIBIDO DE : OLARTE MOURE & ASOCIADOS				NI 830.122.870	
*** Soporte del Pago ***					
TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	181303102	11/01/2013	2.000.000.00
*** Conceptos Pagados ***					
CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO	
1 50005-01-01	SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00	
				\$500.000.00	
=====					
SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE**					
Responsable: 					
Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____					
Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia					
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Linea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240					
Enero 14 de 2013 - 09:56:55					

Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS		
	Dependencia:	Fecha: ____/____/____ AAAA MM DD	Recorrido:
Tipo de Radicación: Entrada: ☐ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			Planilla:
Radicador:			

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13-19546-	0	
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

Item	Unidad de Conservación
1	Bolsa
2	Caja
3	Libro
4	Sobre
5	Tomo
6	Otro
Item	Soporte Documental
7	CD
8	Disquete
9	DVD
10	Folleto
11	Foto
12	Periódico
13	Plano
14	Publicación Periódica
15	USB
10	Otro

Observaciones:
Anexos CD



No. 13-019546- -00000-0000

Fecha: 2013-02-01 17:01:35 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTIL ☐

Art. 33 Decisión 486/00

☐	Indicación que se solicita una patente.
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Descripción de la invención
☐	Dibujos de ser estos pertinentes
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)
Completa ☐	Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

☒	Indicación que se solicita una PCT
☒	Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
☒	Dibujos de ser estos pertinentes
☒	Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)
Completa ☒ CD	Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

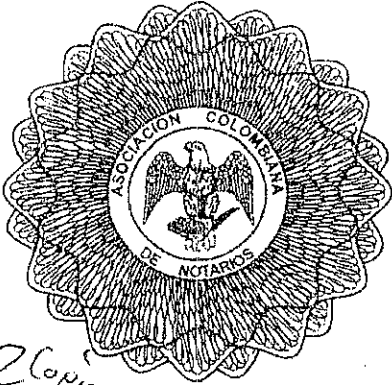
☐	Indicación que se solicita Diseño industrial
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica y fotográfica del Diseño industrial o muestra del material que incorpora el diseño
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

☐	Indicación que se solicita un esquema de trazado
☐	Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
☐	Representación gráfica de un esquema de trazado
☐	Comprobante de pago de las tasas establecidas
Completa ☐	Incompleta ☐

WK 11657662



2 (copia)

18 ENE 2010

.. ESCRITURA PUBLICA NUMERO: (0 0 2 6)

CERO CERO VEINTISEIS. /-----

En la ciudad de Bogotá, Distrito

Capital, República de Colombia, a los

Quince ----- (15) días del mes de

Enero ----- del año dos mil diez -----

(2010), ante mi MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA

-----NOTARIA(O) CUARENTA Y
SEIS (46) DEL CIRCULO DE BOGOTA, se otorgó la escritura
pública que se consigna en los siguientes términos:-----

CLASE(S) DE ACTO: PROTOCOLIZACION POR CARLOS
REINALDO OLARTE GARCIA, JAMES IAN RAISBECK
LLINAS, JUAN GUILLERMO MOURE PEREZ, Y NATALIA
CASTRO VELEZ -----

C.C. Nos. 79.782.747, 79.376.996, 80.412.281 Y 52.008.577.-----

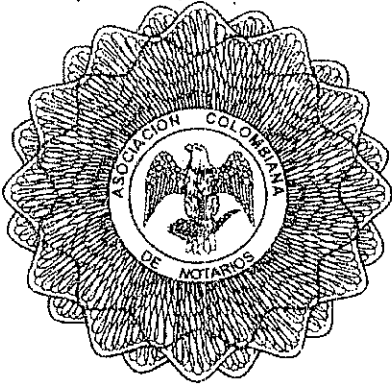
Compareció CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA, mayor de
edad, vecino de Bogotá, identificado con la cédula de
ciudadanía número 79.782.747, de estado civil casado con
sociedad conyugal vigente, JAMES IAN RAISBECK LLINAS
mayor de edad, vecino de ésta ciudad, identificado con la
cédula de ciudadanía número 79.376.996, de estado civil casado
con sociedad conyugal vigente, JUAN GUILLERMO MOURE
PEREZ, mayor de edad, vecino de Bogotá, identificado con la
cédula de ciudadanía número 80.412.281, de estado civil casado
con sociedad conyugal vigente y NATALIA CASTRO VELEZ,
mayor de edad, vecina de Bogotá, identificada con la cédula de
ciudadanía número 52.008.577, de estado civil casada con
sociedad conyugal vigente, obrando en sus propios nombres y
dijeron:-----

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

PRIMERO.- Que presentan para su protocolización y custodia en los archivos de ésta notaría, bajo el número y lugar que a ésta escritura corresponda, en cuatro (4) folios autenticados, un poder, y sus traducciones el cual es del siguiente tenor: --

PODER GENERAL.-----

El suscrito, MERCK SHARP & DOHME, CORP domiciliado en 126 East Lincoln, Avenue Rahway, NJ 07065-0907 United States of America nombramos por el presente a Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro, nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la república de Bolivia, La República del Ecuador, la Republica del Perú y la Republica Bolivariana de Venezuela ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y recon convenciones, formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al



otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que expresa la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin todas las

medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses- -----

Firma X (ilegible) Mark R. Daniel, Managing Counsel, Patents.-

Fecha November 19 2009 -----

Ciudad País: Rahway, NJ, USA.-----

Certificación Notarial- -----

En esta fecha, November 19 -----

El notario Público suscrito Certifica:-----

1. Que Mark R. Daniel mayor de edad y domiciliado 126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065, USA suscribió el documento que antecede -----

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de Managing Counsel, Patents of MERCK SHARP & DOHME CORP, -----

3. Que MERCK SHARP & DOHME con sede principal en 126 East Lincoln Avenue Rahway, NJ 07065-0907, United States of America esta legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden el objeto social. --

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.-----

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2,3 y 4 fue la exhibición de los siguientes documentos auténticos. (Sigue texto sin traducir)-----

Traducción oficial de un documento cuyo original está en

ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

inglés.-----

APOSTILLA

(Convención de la Haya du 5 octobre 1961)

1. País: Distrito de Columbia Estados Unidos de América-----

El presente documento público-----

2. ha sido firmado Por: Violet Burgess-----

3. Actuando en calidad de: Notario Público de New Jersey. ---

4. Lleva el sello/ estampilla de: Violet Burgess, Notario.- ----

Certificado

5 En: ----- Trenton, New Jersey

6. El: ----- 25 de noviembre de 2009

7. Por: ----- R. David Rousseau, Tesorero de New Jersey

8. Bajo el No.: ----- A380889

9. Sello/ estampilla: "El Gran Sello del Estado de New Jersey"

10. Firma: ----- (Firmado)

Certificación: -----

Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.-----

Documento: "Apostilla"-----

Fecha: 11 de Diciembre de 2009.-----

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia).-----

Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia.

Dirección Carrera 15 # 99-13 Of. 411, Bogotá D.C.-----

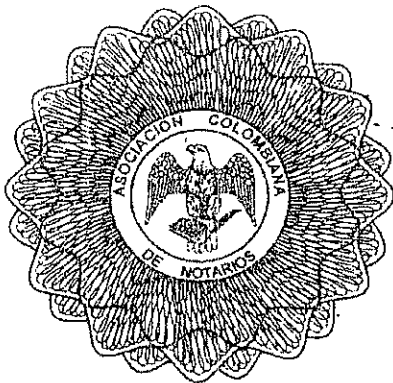
Teléfonos (571) 218 23 08 (571) 623 29 25.- -----

E-mail: treser1@yahoo.com-----

Traducción # 14-278.- -----

SEGUNDO.- Que solicita a la señora Notaria la incorporación de dichos documentos al protocolo de ésta notaría para que de

WK 11657664



su tenor se expidan las copias que más adelante se soliciten -----

La notaría advierte a los interesados que la protocolización de documentos no da mayor fuerza o autenticidad de la que tienen dichos documentos.-----

Esta escritura pública fue firmada fuera del Despacho Notarial, de conformidad con el artículo 12 del Decreto 2.148 de 1.983. -

Se advirtió a los otorgantes de esta escritura de la obligación que tienen de leer la totalidad de su texto, a fin de verificar la exactitud de todos los datos en ella consignados, con el fin de aclarar, modificar o corregir lo pertinente antes de firmarla, la firma de la misma demuestra su aprobación total del texto, en consecuencia, la notaria no asume ninguna responsabilidad por errores o inexactitudes establecidas con posterioridad a la firma de (el, los) otorgante(s) y de la notaría, en tal caso, este (os) debe(n) ser corregidos mediante el otorgamiento de una nueva escritura, suscrita por todos los que intervinieron en la inicial y sufragada por los mismos (artículo 35, decreto ley 960 de 1970).- -----

ADVERTENCIA, OTORGAMIENTO Y AUTORIZACION.- Leído el presente instrumento por el (los) compareciente (s) y advertido (s) sobre las formalidades legales, lo aprueban y firman conmigo y ante mí la(el) Notaria(o) quién lo autoriza. A los otorgantes se les advirtió finalmente que una vez firmado el presente instrumento, La(el) Notaria(o) no aceptará correcciones o modificaciones sino en la forma y casos

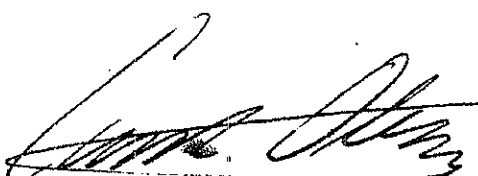
ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO

previstos por la Ley. ---Se utilizaron las hojas de papel
Notarial Nos .WK 11657662, WK 11657663, WK 11657664 Y WK 11657665. /-

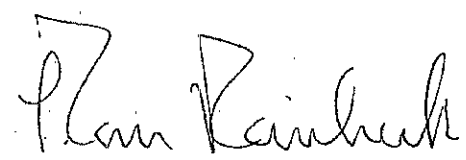
DERECHOS LEGALES: \$ 42.860.00. - / - - - - -

RESOLUCIONES 9306 Y 9500 DE 2008 - - - - -

IVA \$ 11.682.00. - / - - - - -


CARLOS REINALDO OLARTE GARCIA

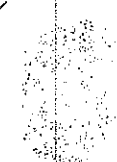
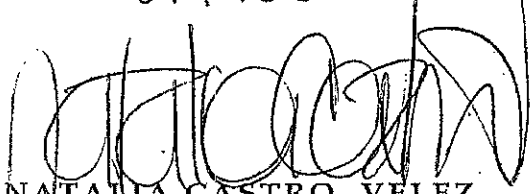
C.C.No. 79.782.747 Btd
TEL: 6017700


JAMES IAN RAISBECK LLINAS

C.C.No. 79.376.996 Btd
TEL: 6017700


JUAN GUILLERMO MOURE PEREZ

C.C.No. 80412281
TEL: 6017700


NATALIA CASTRO VELEZ,
C.C.No. 5200857.
TEL: 6017700.

Apostilla:

APOSTILLA:

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. País: Estados Unidos de América
El presente documento público
2. Ha sido firmado por: Violet Burgess
3. Actuando en calidad de: Notario Público de New Jersey
4. Lleva el sello/estampilla de: Violet Burgess, Notario

Certificado

5. En: Trenton, New Jersey
6. El: 25 de noviembre de 2009
7. Por: R. David Rousseau, Tesorero de New Jersey
8. Bajo el No.: A380889
9. Sello / estampilla: "El Gran Sello del Estado de New Jersey"
10. Firma: (Firmado)

Certificado No. 115832008

Verifique este certificado por internet en:

<https://www1.state.nj.us/TYTR->

StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp

Certificación:

Certifico que la presente es una traducción auténtica y completa del inglés al español del documento adjunto, la cual he elaborado según mi leal saber y entender.

Documento: "Apostilla"

Fecha: 11 de diciembre de 2009.

Traductor: Jorge Enrique Sierra Reyes (Sello y firma digital debidamente registrados ante el Ministerio de Relaciones Exteriores de Colombia)

Licencia # 376 de 1993, expedida por el Ministerio de Justicia.

Dirección: Carrera 15 # 99-13 Of. 411, Bogotá, D.C.

Teléfonos: (571) 218 2308, (571) 623 2925.

E-mail: jeseser1@yahoo.com

Traducción # 14-278

Traductor

JORGE E. SIERRA REYES

Licencia 376 - 1993 Minjusticia

MINISTERIO DE
RELACIONES EXTERIORES

2009 DIC 19 A 12:07

JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD
DEL TEXTO

003841

Jorge Sierra
UNA FIRMA APARECE EN EL
DOCUMENTO DESEMPENA
LAS FUNCIONES INDICADAS

The undersigned, **General Power**

El suscrito, **Poder General**

MERCK SHARP & DOHME CORP.

domiciled in

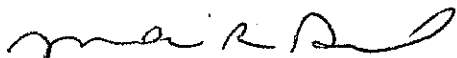
domiciliado en

126 East Lincoln, Avenue Rahway, NJ 07065-0907

United States of America

by means of these presents hereby grants to **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, legal representatives with faculties to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents in patent matters, who at the same time have the faculty to represent us before the administrative, judicial or police authorities of any hierarchy of the Republic of Colombia, the Republic of Bolivia, the Republic of Ecuador, the Republic of Peru, and the Bolivarian Republic of Venezuela, to initiate before said authorities all the necessary actions to accomplish said purposes and to intervene in all instances, grades and procedural levels; to file and prosecute applications, declarations, complaints, to claim, counterclaim, answer claims and counterclaims; to draw up specifications; to make amendments; oppositions and all types of objections and writings of any nature; cancellations and administrative injunction proceedings; to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive documents and monies; act as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to request preliminary injunctions of any nature, settle, make arrangements, to submit to arbitrators, to desist from claims or procedures, to accept claims, to collect, to ratify legal proceedings subscribed before the appointment and/or presentation of this Power, substitute or delegate the legal representation and other acts prescribed by law, in short, with all such further powers as may be required; to comply with all other requirements and, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests.

nombramos por el presente a **Carlos R. Olarte y/o J. Ian Raisbeck y/o Juan Guillermo Moure y/o Natalia Castro**, nuestros representantes legales con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales en materia de patentes, los cuales quedan a su vez facultados para representarnos ante las autoridades de cualquier jerarquía de la República de Colombia, la República de Bolivia, la República del Ecuador, la República del Perú y la República Bolivariana de Venezuela, ya sean administrativas, judiciales o de policía, para iniciar ante dichas autoridades todas las acciones necesarias para cumplir con el objeto indicado e intervenir en todas las instancias, grados o etapas procesales; elevar y tramitar solicitudes, declaraciones y reclamos, para demandar, reconvenir, contestar demandas y reconveniones; formular descripciones, enmiendas, oposiciones y todo tipo de impugnaciones y escritos de cualquier naturaleza; instaurar cancelaciones y amparos administrativos; abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar cualquier otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores; intervenir como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo solicitar medidas cautelares de cualquier naturaleza, conciliar, transar, someter a árbitros, desistirse de la pretensión y/o el procedimiento, allanarse a la pretensión, percibir, ratificar los actos jurídicos procesales suscritos con anterioridad al otorgamiento y/o presentación del presente poder, sustituir o delegar la representación procesal y los demás actos que exprese la ley, con todas las demás facultades que resulten necesarias; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeran conducentes al resguardo de nuestros intereses.



Signature/Firma: X

Mark R. Daniel, Managing Counsel, Patents

Date/Fecha: November 17,

2009

City/Country/Ciudad,País: Rahway, NJ, USA

Diagonal 34 N° 5 - 28, Bogotá D.C., Colombia

Tel + 57 1 601-7700, Fax + 57 1 601-7799, office@olarteraisbeck.com, www.olarteraisbeck.com

NOTARIA CUARENTA Y SEIS
HELE LUZ ALDINO LOZANO

MODEL OF NOTARIAL CERTIFICATION

Notarial Certification

On this date, November 17

2009

The undersigned Notary Public certifies:

1. That

of legal age and domiciled in

126 East Lincoln Avenue, Rahway, NJ 07065, USA.

signed the foregoing document.

2. That the grantor has executed the foregoing document as Managing Counsel, Patents of MERCK SHARP & DOHME CORP.

3. That MERCK SHARP & DOHME CORP,

having its principal place of business located in 126 East Lincoln, Avenue Rahway, NJ 07065-0907, United States of America

is duly incorporated, is currently in existence, and that the purposes for which the General Power is granted are within the scope of its corporate purposes.

4. That the grantor has the authority to execute the General Power and that his/her representation is legal.

5. The foundation for my certifications contained in points 2, 3 and 4 was the exhibition of the following authentic document(s):

Corporate Resolution No. 5 - Patent Matters adopted November 3, 2009

C. St. Ruyter
NOTARY PUBLIC (Signature):

VIOLET BURGESS
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
My Commission Expires May 30, 2012

Certificación Notarial

En esta fecha,

el Notario Público suscrito certifica:

1. Que

Mark R. Daniel

mayor de edad y domiciliado

suscribió el documento que antecede.

2. Que el otorgante ha suscrito el referido documento en su carácter de

4. Que

con sede principal ubicada en

está legalmente constituida, que tiene existencia legal vigente y que los propósitos para los cuales se otorga el poder se encuentra dentro de los que comprenden su objeto social.

4. Que el otorgante tiene la representación para suscribir el poder, y que ésta es legítima.

5. El fundamento de mis certificaciones contenidas en los puntos 2, 3 y 4 fue la exhibición de los (del) siguiente(s) documento(s) auténtico(s):

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961)

1. COUNTRY: UNITED STATES OF AMERICA
2. THIS PUBLIC DOCUMENT HAS BEEN SIGNED BY:
VIOLET BURGESS
3. ACTING IN THE CAPACITY OF:
NOTARY PUBLIC OF NEW JERSEY
4. BEARS THE SEAL/STAMP OF:
VIOLET BURGESS, NOTARY

CERTIFIED

5. AT TRENTON, NEW JERSEY
6. THE 25TH DAY OF NOVEMBER 2009
7. BY: R. David Rousseau, NEW JERSEY TREASURER
8. NO: A380889
9. SEAL/STAMP:
10. SIGNATURE



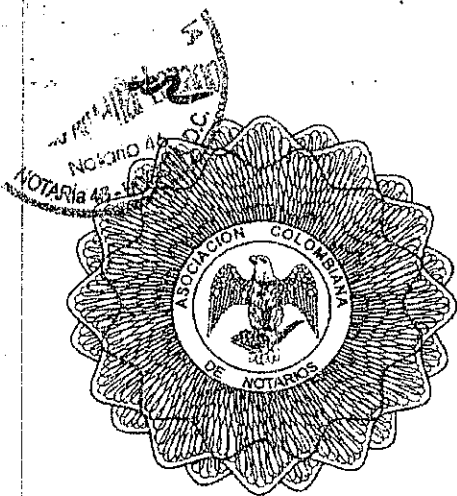
NOTARIA CUARENTA Y SEIS
Hella Luz Altamir Lozano

Certificate Number: 115832008

Verify this certificate at
https://www1.state.nj.us/TYTR_StandingCert/JSP/Verify_Cert.jsp



WK 11657665



ESTA HOJA HACE PARTE DE LA
 ESCRITURA PUBLICA NUMERO : (0 0 2 6)
 DE FECHA: 15 DE ENERO DE 2.010. - - - -
 NOTARIA CUARENTA Y SEIS (46) DE BOGOTA
 REFERENTE A LA
 PROTOCOLIZACION DE CARLOS
 REINALDO OLARTE GARCIA,

JAMES IAN RAISBECK LLINAS, JUAN GUILLERMO MOURE
 PEREZ, Y NATALIA CASTRO VELEZ. - - - - -

Maria Eugenia Rojas de Urqueta
 MARIA EUGENIA ROJAS DE URUETA

NOTARIA(O) CUARENTA Y SEIS (46) D

redb.



liber y Tercera 3^{ra};
 fotocopia de la Escritura Pública No. 26
 de fecha 15 de Enero de 2010
 Tomada de su original que expido en
Siete (7) hojas útiles de papel
 común autorizado (Decreto 1343 de 1970) con destino a

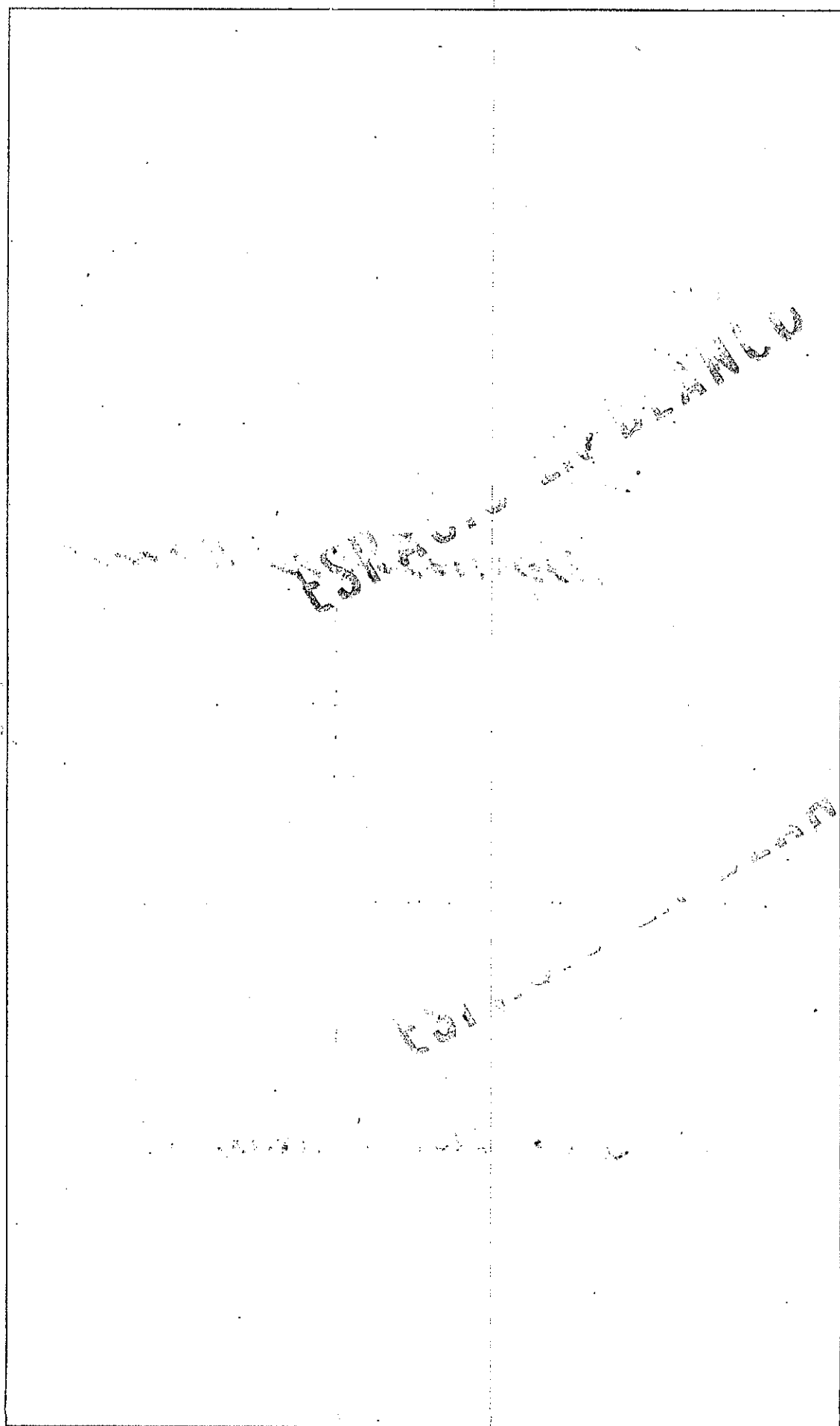
Interesado

Oído en Bogotá, D.C., a 10 MAR. 2010
 La Notaria Cuarenta y Seis de Bogotá, D.C.

Felicia Luz Altamira



ESTE PAPEL NO TIENE COSTO PARA EL USUARIO





(51) International Patent Classification:

A61K 39/25 (2006.01) A61K 39/285 (2006.01)
A61K 39/245 (2006.01) C12N 7/04 (2006.01)
A61K 39/275 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/US2011/046534

(22) International Filing Date:

4 August 2011 (04.08.2011)

(25) Filing Language:

English

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

61/371,038 5 August 2010 (05.08.2010) US

(71) Applicant (for all designated States except US): **MERCK SHARP & DOHME CORP.** [US/US]; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US).

(72) Inventors; and

(71) Applicants (for NZ, US only): **KRAH, David, L.** [IN/US]; 770 Sumneytown Pike, West Point, Pennsylvania 19486 (US). **DEHAVEN, Jill** [US/US]; 2241 Oak Terrace, Lansdale, Pennsylvania 19446 (US). **KRISS, Jennifer, A.** [US/US]; 770 Sumneytown Pike, West Point, Pennsylvania 19486 (US). **BARR, Colleen, M.** [US/US]; 770 Sumneytown Pike, West Point, Pennsylvania 19486 (US).

nia 19486 (US). **YAGODICH, Mary** [US/US]; 770 Sumneytown Pike, West Point, Pennsylvania 19486 (US).

(74) Common Representative: **MERCK SHARP & DOHME CORP.**; 126 East Lincoln Avenue, Rahway, New Jersey 07065-0907 (US).

(81) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

[Continued on next page]

(54) Title: INACTIVATED VARICELLA ZOSTER VIRUS VACCINES, METHODS OF PRODUCTION, AND USES THEREOF

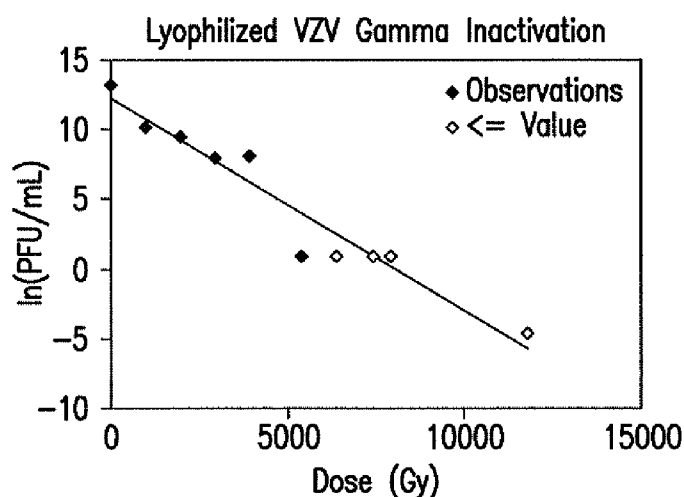


FIG. 1

(57) Abstract: The invention provides an inactivated varicella zoster virus (VZV), and compositions and vaccines comprising said inactivated VZV, wherein the infectivity of the VZV is undetectable and wherein the inactivated VZV induces an immune response against VZV when administered to a patient. In embodiments of the compositions described herein, the VZV is inactivated with gamma radiation. The invention also provides a method of preparing an inactivated VZV vaccine, the method comprising gamma irradiating a sample comprising a VZV using from about 5 kGy to about 50 kGy of gamma radiation. Also provided by the invention herein is a method of treatment of or immunization against HZ or other disease associated with the reactivation of VZV, the method comprising administering to a subject a vaccine or pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an inactivated VZV and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the VZV is inactivated by gamma irradiation.

**Declarations under Rule 4.17:**

- *as to applicant's entitlement to apply for and be granted a patent (Rule 4.17(ii))*
- *as to the applicant's entitlement to claim the priority of the earlier application (Rule 4.17(iii))*

Published:

- *with international search report (Art. 21(3))*
- *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments (Rule 48.2(h))*

TITLE OF THE INVENTION

INACTIVATED VARICELLA ZOSTER VIRUS VACCINES, METHODS OF PRODUCTION, AND USES THEREOF

5 FIELD OF THE INVENTION

The invention relates to compositions and methods for the prevention and treatment of herpes zoster. More specifically, the invention relates to vaccine compositions comprising inactivated varicella virus vaccine (VZV) and methods for producing said compositions.

10 BACKGROUND OF THE INVENTION

Primary infection with varicella zoster virus (VZV) causes chicken pox, usually in children and young adults. Although clinical manifestations of chicken pox typically resolve without medical intervention within a short period of time, the VZV can remain latent in sensory neurons for many years following infection. Reactivation and replication of latent VZV, often decades later, can lead to herpes zoster (HZ), commonly known as shingles, a painful rash that is generally limited to a single dermatome. Such VZV reactivation correlates with a decline in cell-mediated immunity, which occurs in the elderly or those who are immunocompromised (Weinberg *et al.*, *Journal of Infectious Diseases* (2009) 200: 1068-77). In some patients, pain associated with HZ can persist for months or even years after the HZ rash has healed, a complication referred to as post-herpetic neuralgia (PHN).

A live attenuated vaccine (ZOSTAVAX®, Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ) is currently available for the prevention of herpes zoster in healthy elderly patients (US Patent Nos. 6,214,354 and 5,997,880). This vaccine has markedly reduced the adverse impacts of HZ in immunocompetent patient populations (Oxman, MN, *Clin Infect Dis.* (2010) 51(2):197-213; Sanford and Keating, *Drugs Aging* (2010) 27(2):159-76; Oxman *et al.*, *N. Engl. J. Med.* (2005) 352: 2271-83). However, live attenuated vaccines may not be suitable for immunocompromised patients.

Immunocompromised individuals, including patients suffering from hematologic malignancy, patients undergoing immunosuppressive therapies, patients who have received a hematopoietic stem cell transplant (HCT) or solid organ transplant (SOT), HIV-infected patients, and patients with autoimmune diseases, have a higher incidence of developing HZ relative to the general population. In addition, these patient populations are at increased risk for developing severe and life-threatening complications (Gourishankar *et al.* (2004) *Am J Transplant* 4: 108-115, Ragozzino *et al.* (1982) *Medicine (Baltimore)* 61: 310-316, Wung *et al.* (2005) *Am J Med* 118: 1416.e9-1416.e18, Dworkin & Schmader (2003) *Clinical Infectious Diseases* 36: 877-882, Gebo *et al.* (2005) *J Acquir Immune Defic Syndr* 40:

169-174, Mattiuzzi *et al.* (2003) *Clinical Cancer Research* 9: 976-980, Dworkin *et al.* (2003) *Neurology* 60: 1274-1283.) such as meningoencephalitis (Tauro *et al.* (2000) *Bone Marrow Transplant* 26: 795-796), transverse myelitis, visual impairment (Walton *et al.* (1999) *Bone Marrow Transplant* 23: 1317-1320), pneumonitis (Wacker *et al.* (1989) *Bone Marrow Transplant* 4: 191-194), hepatitis (Rogers *et al.* (1995) *Bone Marrow Transplant* 15: 805-807; Schiller *et al.* (1991) *Bone Marrow Transplant* 7: 489-491), bacterial superinfection, cutaneous scarring and disfigurement (Schuchter *et al.* (1989) *Blood* 74: 1424-1427). Despite the high risk of morbidity and mortality associated with HZ in immunocompromised individuals, this population is not eligible for vaccination with a live attenuated vaccine against HZ such as ZOSTAVAX®. Thus, there is a significant need for a vaccine that would be safe and effective in immunocompromised patient populations to prevent HZ or reduce the severity or duration of HZ or associated complications.

Safety concerns regarding immunocompromised patients have led researchers to investigate the use of non-replicating vaccines against viral pathogens such as subunit vaccines, virus-like particle vaccines and inactivated whole vaccines. Many approved inactivated vaccines contain viruses that are inactivated using formalin, including hepatitis A, polio, and Japanese encephalitis vaccines. For HZ, it has been suggested that a safer vaccine for immunocompromised subjects could be developed through heat inactivation of the VZV or through the use of a subunit vaccine (Cohen, J.I., (2008) *J. Infect. Dis.* 197(Suppl 2): S237-S241). Redman *et al.* (*J. Infectious Diseases* (1997) 176: 578-85) describe an inactivated VZV vaccine which was inactivated by heating at 50°C, resulting in an infectious virus content of ≤ 1.2 pfu/0.5 mL. This level of infectivity would not be desirable for a product to be administered to immunocompromised patients. US Patent Nos. 6,214,354 and 5,997,880 also mention the potential of using an inactivated VZV vaccine and disclose an example of the production and testing of a heat-treated vaccine.

It would meet a significant medical need if a method of inactivating VZV were developed that resulted in a VZV sample that was safe and effective in immunocompromised patients, i.e., lacked residual infectivity but retained the immunogenicity and antigenicity of a non-inactivated sample.

SUMMARY OF THE INVENTION

It has been shown herein that a VZV sample can be inactivated with gamma irradiation so that the infectivity of the VZV in the sample is at an undetectable level; however, there is no significant loss in immunogenicity and/or antigenicity and no significant change in structure of the VZV upon inactivation by the methods described herein relative to a VZV sample that has not been inactivated.

In one aspect, the invention provides an inactivated varicella zoster virus (VZV), wherein the infectivity of the VZV is undetectable and wherein the inactivated VZV induces an immune response against VZV when administered to a patient. Also provided is a pharmaceutical composition/vaccine comprising a therapeutically effective amount of the inactivated VZV and a pharmaceutically acceptable carrier. The compositions of the invention are either liquid or in a frozen state, e.g. lyophilized. In some embodiments of the compositions described herein, the VZV is inactivated with gamma radiation.

In another aspect, the invention provides a method of preparing an inactivated VZV vaccine, the method comprising gamma irradiating a sample comprising a VZV using from about 5 kGy to about 50 kGy of gamma radiation. In preferred embodiments, the source of gamma radiation is ⁶⁰Co, although other isotopes known in the art may also be useful in this regard. In some embodiments of the method of preparation disclosed herein, the sample is lyophilized prior to irradiating. In alternative embodiments, a liquid bulk is exposed to the gamma radiation, without first being lyophilized.

The invention also provides a method of treatment of or immunization against HZ or other disease associated with reactivation of VZV, the method comprising administering to a subject a vaccine or pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of an inactivated VZV and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the VZV is inactivated by gamma irradiation. In some embodiments of the methods of treatment described herein, the route of administration of the composition/vaccine is subcutaneous or intramuscular. In specific embodiments of this aspect of the invention, the patient is 50 years of age or older and/or immunocompromised.

As used throughout the specification and in the appended claims, the singular forms "a," "an," and "the" include the plural reference unless the context clearly dictates otherwise.

As used throughout the specification and appended claims, the following definitions and abbreviations apply:

The term "treatment" refers to both therapeutic treatment and prophylactic or preventative measures. Individuals in need of treatment include those already with the disorder as well as those prone to have the disorder or those in which the disorder is to be prevented. Treatment of a patient with the inactivated VZV of the invention includes one or more of the following: inducing/increasing an immune response against VZV in the patient, preventing, ameliorating, abrogating, or reducing the likelihood of reactivation of VZV in patients who have been infected with varicella or received a live VZV vaccine, preventing or reducing the likelihood of developing HZ and/or other disease or complication associated with VZV reactivation such as PHN, reducing the severity or duration of HZ and/or other disease or complication associated with the reactivation of VZV, such as PHN.

The term "therapeutically effective amount" means a sufficient vaccine composition to produce a desired effect, including, but not limited to: inducing/increasing an immune response against VZV in a patient, preventing, ameliorating or abrogating reactivation of VZV in patients who have been infected with varicella or received a live VZV vaccine, preventing HZ and/or PHN, reducing the severity or duration of HZ and/or PHN. One skilled in the art recognizes that this level may vary.

The term "immune response" refers to a cell-mediated (T-cell) immune response and/or an antibody (B-cell) response.

The term "patient" refers to any human being that is to receive the inactivated VZV vaccines, or pharmaceutical compositions, described herein, including both immunocompetent and immunocompromised individuals. As defined herein, a "patient" includes those already infected with VZV, either through natural infection or vaccination.

The term "bulk" refers to a liquid formulation or composition comprising more than one dose of vaccine.

The term "undetectable levels," in reference to the infectivity of a particular vaccine formulation or composition, means that the formulation or composition comprises ≤ 0.050 infectious units or plaque-forming units ("PFU's") of infectious VZV virus per mL of sample, preferably ≤ 0.040 PFU's/mL, ≤ 0.030 PFU's/mL, ≤ 0.020 PFU's/mL, ≤ 0.015 PFU's/mL, ≤ 0.010 PFU's/mL, ≤ 0.009 PFU's/mL, or ≤ 0.008 PFU's/mL, more preferably ≤ 0.007 PFU's/mL, ≤ 0.006 PFU's/mL, ≤ 0.005 PFU's/mL, ≤ 0.004 PFU's/mL ≤ 0.003 PFU's/mL, more preferably ≤ 0.002 PFU's/mL, or ≤ 0.001 PFU's/mL. The PFU's of a particular sample may be determined using, for example, a varicella plaque assay such as the assay described in Example 1 and further described in Krah *et al.* (*J. Virol. Methods* (1990) 27: 319-26). The infectivity of a sample may also be confirmed by an immunostaining method, as described in Example 1.

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1 shows the inactivation kinetics of γ -irradiated lyophilized VZV (log PFU/ml v. dose of radiation, see Example 4). VZV vials were irradiated with different levels of ^{60}Co rays using a ^{60}Co Gammacell® irradiator. The residual PFU/mL of each vial per dose of radiation (Gy) was determined using the varicella plaque assay in MRC-5 cells. Observed data points are shown as dark colored diamonds ("observations") and the maximum data measurable by the assay is shown by gray diamonds (" $\leq$ Value").

Figure 2 shows inactivation kinetics of γ -irradiated VZV bulk (log pfu/mL titer against radiation time, see Example 4). Different levels of ^{60}Co rays were used to irradiate VZV bulk. The irradiated bulk was analyzed for residual infectivity in a varicella plaque assay using MRC-5 cells.

Figures 3A-3F show the VZV response (SFC/ 10^6 PBMC) after VZV was inactivated under different conditions as measured by the VZV IFN γ ELISPOT assay (see Example 5). Data are shown for 6 donor PBMC samples (figures A-F) for five heat-treated VZV bulk preparations and two gamma-irradiated VZV bulk preparations. Also shown are the VZV responses for live (untreated) VZV samples from the same bulk preparations as those used above and a lot of VZV that was inactivated by treatment with UV light (VZV lot # 96.07).

Figures 4A-4C show pictures of VZV viral particles, as assessed by cryo EM (See Example 6). Shown are lyophilized samples that were untreated (Figure 4A), irradiated with 25 kGy (Figure 4B) and irradiated with 50 kGy (Figure 4C).

Figure 5 shows the results of a mouse immunogenicity study in which the VZV titer (IgG response) for a set of inactivated VZV preparations generated using various methods for inactivation (see Example 8) were evaluated in the VZV ELISA assay. The adjusted VZV titers (VZV titer minus MRC-5 titer) are shown for each mouse, along with the geometric mean titer. Also shown are the results from 2 mice in the heat-treated lyophilized group that were considered to be outliers.

Figure 6 shows the statistical analysis of VZV gpELISA antibody responses by time points among human vaccine recipients who received either heat-treated VZV vaccine (N=65) or gamma-irradiated VZV vaccine (N=63) as described in Example 9.

Figure 7 shows the statistical analysis of VZV gpELISA antibody responses by time points among human vaccine recipients who received either gamma irradiated VZV vaccine B (16-25 kGy, N=64) or gamma irradiated vaccine C (25-50 kGy, N=65), as described in Example 10.

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION

It has been shown herein that a bulk or lyophilized VZV sample can be inactivated with gamma irradiation so that the infectivity of the VZV in the sample is at an undetectable level (for example, the infectivity of inactivated VZV samples described herein was ≤ 0.001 PFUs/mL). The inactivated VZV produced by the methods described herein can be formulated with a pharmaceutically acceptable carrier to produce a pharmaceutical composition or vaccine for use in methods of treatment/immunization of the invention. There is no significant loss in immunogenicity and/or antigenicity and no significant change in structure of the VZV upon inactivation by the methods described herein relative to a VZV sample that has not been inactivated. Thus, when the pharmaceutical compositions of the invention are administered to a patient, the immune response elicited by the composition is not significantly different than the immune response elicited by a control sample comprising the same amount of the VZV that has not been inactivated. As used herein, an immune response elicited by an

inactivated sample that is “not significantly different” from a non-inactivated control sample differs from the control sample by about 50% or less, more preferably about 40 % or less, about 30 % or less, even more preferably about 20% or less, 15% or less, 10% or less, or 5% or less.

5 The immune response elicited by an inactivated and a control sample may be measured in an appropriate animal model or human population in a clinical trial, for example, by measuring one or more of the following parameters: (1) the VZV specific responder cell frequency (as described in Calandra *et al.*, WO 94/002596, (2) the anti-VZV cytotoxic T-cells (CTL's), or VZV specific CD8⁺ cells, (3) the anti-VZV helper T-cells, or VZV specific CD4⁺
10 cells, (4) the level of anti-VZV specific antibodies, or (5) the level of lymphokines such as interferon, or interleukin.

Techniques that are useful for measuring the immune response are known in the art and include, but are not limited to: a T-cell response assay, a potency assay, a VZV IFN γ ELISPOT assay, and an ELISA assay.

15 To determine the sufficiency of the immune response elicited by the vaccines/ pharmaceutical compositions of the present invention and made by the methods described herein, and also the efficacy of the inactivated vaccine, it may be useful to measure clinical outcomes in a clinical trial of human volunteers/subjects to measure, for example, a reduction of the duration or severity of HZ and/or a reduction in the duration of PHN in an individual to a
20 period of less than one month following development of zoster, reduction in the incidence of zoster in the patient population, on a statistical level, below the incidence found in the general population or of similarly at-risk or immunocompromised individuals.

As stated above, the present invention shows that VZV preparations can be inactivated to undetectable levels, while still retaining the antigenicity and immunogenicity of a
25 similar non-inactivated VZV. Accordingly, one aspect of the invention provides an inactivated VZV, wherein the infectivity of the VZV is undetectable and wherein the inactivated VZV induces an immune response against VZV when administered to a patient.

One skilled in the art can readily determine a proper amount of VZV antigen to be used as a therapeutically effective amount of VZV. Such amount will vary according to
30 intended use, or other factors such as the particular patient population. In some embodiments of the methods and compositions described herein, the amount of VZV is from about 1 to about 10 VZV antigen units/dose, with 1 VZV antigen unit being roughly equivalent to 1 μ g of purified VZV protein. In specific embodiments, the amount of VZV antigen present in a composition is between about 2 and about 8 VZV Ag units/dose or between about 3 and about
35 6 VZV Ag units/dose. The amount of antigen can be determined with an appropriate antigen assay, for example, the competitive ELISA described in Example 2 herein. One skilled in the art can determine other appropriate assays to measure the amount of antigen in a sample.

Also provided herein is a pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of the inactivated VZV described above and a pharmaceutically acceptable carrier, excipient or diluent. Pharmaceutically acceptable carriers useful in the compositions of the invention include any compatible agent that is nontoxic to patients at the dosages and concentrations employed, such as water, saline, dextrose, glycerol, ethanol, buffers, and the like, and combinations thereof. The carrier may also contain additional components such as a stabilizer, a solubilizer, a tonicity modifier, such as NaCl, MgCl₂, or CaCl₂ etc., a surfactant, and mixtures thereof.

The invention also provides multi-dose compositions which contain more than one dose of the inactivated VZV, an anti-microbial preservative, which prevents inadvertent microbial contamination upon introduction of a syringe to the vial comprising the composition, and a pharmaceutically acceptable carrier. Such multi-dose compositions can be provided to a patient more than one time, after a predetermined amount of time has passed or to more than one patient.

In some embodiments of the invention, the composition is a liquid bulk which contains more than one dose of inactivated VZV. In alternative embodiments, the composition is lyophilized. Methods of lyophilization are known in the art. Also encompassed by the invention is a lyophilized formulation that is reconstituted with an appropriate diluent such as sterile water for injection or bacteriostatic water for injection.

Gamma irradiation is commonly used to sterilize devices and equipment for use in medical applications. It is also used to kill any potential pathogens in biologicals, such as blood products and antibody preparations. For these uses, an organism is inactivated without regard to maintaining the function of the organism. There are limited literature sources that describe the inactivation of viruses by gamma irradiation.

Rosen *et al.* (*Int. J. Radiat. Biol.* 52:795-804 (1987)) evaluated herpes simplex virus intact virus particles for survival of plaque-forming ability and purified genomes for damage to DNA molecules after treatment with ⁶⁰Co rays. This study did not evaluate the antigenicity or immunogenicity of the virus after irradiation. Another study by Elliott *et al.* (*J. Clin. Microbiol.* 16: 704-708 (1982)) evaluated the inactivation of Lassa, Marburg, and Ebola viruses using ⁶⁰Co rays. Linear kinetics of inactivation were observed for Lassa, Ebola, and Marburg viruses and virus inactivation was achieved by gamma irradiation using ⁶⁰Co rays. Elliott *et al.* observed that a greater dose of radiation was required for inactivation of the virus in the frozen state than the liquid state. Like Rosen *et al.*, this study failed to determine the antigenicity or immunogenicity of the viruses after gamma irradiation. Alsharifi *et al.* (WO 2010/012045) describe the use of gamma irradiation to inactivate influenza virus, an RNA virus from the family Orthomyxoviridae, for use as a vaccine.

In the invention described herein, it is shown that gamma radiation can reduce the infectivity of a VZV viral preparation to undetectable levels, while retaining the antigenicity, immunogenicity and structural characteristics of a non-inactivated control. Thus, in preferred embodiments of the invention, the VZV is inactivated by gamma irradiation, which can be delivered to the VZV by exposure to an appropriate isotope such as ^{60}Co , $^{137}\text{Cesium}$, $^{99}\text{Technetium}$ or $^{99\text{m}}\text{Tc}$. In preferred embodiments, the gamma radiation is delivered to the VZV by exposure to ^{60}Co rays.

The amount of gamma radiation useful for inactivating the VZV is from about 5 to about 50 kiloGrays (kGy) of gamma radiation. A Gray (Gy) is a standard unit of absorbed dose, with one gray being equal to an absorbed dose of 1 Joule/kilogram (100 rads). One skilled in the art will realize that the amount of radiation exposed to the sample and amount of time should be varied in order to reach a desired absorbed dose of radiation (dose = fluence x time). One skilled in the art will also be able to vary the amount of radiation that the sample is exposed to depending on the size of the container within which the sample is being stored so that the proper dose of radiation is delivered to the entire sample without over-exposing a portion of the sample, for example, the portion closest to the radioactive source.

In some embodiments of the methods and compositions of the invention described herein, the amount of gamma radiation used to inactivate the VZV is about 25 kGy or less. In alternative embodiments, the amount of gamma radiation is in the range of about 5 kGy to about 40 kGy, about 5 kGy to about 35 kGy, about 5 kGy to about 30 kGy, about 5 kGy to about 25 kGy, about 5 kGy to about 20 kGy, about 5 kGy to about 10 kGy, about 10 kGy to about 50 kGy, 10 kGy to about 40 kGy, about 10 kGy to about 35 kGy, about 10 kGy to about 30 kGy, about 10 kGy to about 25 kGy, about 10 kGy to about 20 kGy, about 15 kGy to about 50 kGy, about 15 kGy to about 40 kGy, about 15 kGy to about 35 kGy, about 15 kGy to about 30 kGy, about 15 kGy to about 25 kGy, about 15 kGy to about 20 kGy.

The invention also provides a pharmaceutical composition as described above, and methods of producing said composition, wherein the composition is a liquid bulk and the amount of gamma radiation used to inactivate the VZV is from about 5 kGy to about 10 kGy or from about 5 kGy to about 12.5 kGy. In other specific embodiments, the composition is lyophilized prior to gamma irradiation and in such embodiment, the amount of gamma radiation is from about 5 kGy to about 25 kGy or from about 15 kGy to about 25 kGy.

It is shown herein that linear inactivation kinetics were observed for VZV inactivated with gamma radiation, which is of significant benefit in allowing modeling of inactivation, i.e. reliably estimating the level of residual infectivity in a sample comprising inactivated VZV. Such linear inactivation kinetics were not observed for heat treated inactivated VZV. Grieb *et al.* (*Biologicals* (2002) 30:207-216 and *Biomaterials* (2005) 26:2033-2042) described two specific mechanisms for the inactivation of viruses by gamma

irradiation, which support the linear inactivation kinetics observed for VZV. The first mechanism is a "direct result of a photon depositing energy into the target". This direct energy transfer results "in the dislocation of outer electrons from molecules and breakage of covalent bonds." The second, "indirect", mechanism is a result of a chemical attack on free radicals and reactive oxygen species typically generated by the interaction of radiation with water molecules and oxygen. In specific embodiments of the compositions and methods described herein, the VZV is lyophilized prior to inactivation with gamma radiation; thus, there is unlikely to be much interaction with water molecules because water is removed from the product in the lyophilization process.

Redman *et al.* (*J. Infectious Diseases* (1997) 176: 578-85) describe an inactivated VZV vaccine which was inactivated by heating to 50°C, resulting in an infectious virus content of ≤ 1.2 pfu/0.5 mL. The heat-treated vaccine described by Redman and colleagues was shown to reduce disease severity associated with VZV reactivation among 24 patients scheduled to undergo autologous BMT or peripheral blood stem-cell infusion or other BMT. This level of infectivity is not suitable for all patients, such as those who are immunocompromised. In addition, methods of inactivation of VZV using heat treatment require lengthy periods of time to reach low levels of infectivity, which is inefficient and not cost-effective.

To that end, the invention provides inactivated VZV and pharmaceutical compositions/vaccines comprising said inactivated VZV, wherein the infectivity of the VZV is at an undetectable level, i.e. ≤ 0.050 PFU's/mL, said inactivated VZV compositions being safer than previously disclosed vaccines for the treatment and/or prevention of HZ or disease associated with VZV reactivation and suitable to a more efficient manufacturing process. The inactivated VZVs of the present invention retain the structural physical characteristics, immunogenicity and antigenicity of a non-inactivated VZV control following inactivation. In some embodiments, the infectivity is ≤ 0.040 PFU's/mL, ≤ 0.030 PFU's/mL, or ≤ 0.020 PFU's/mL. The invention also provides embodiments wherein the number of infectious units is ≤ 0.015 PFU's/mL, ≤ 0.010 PFU's/mL, ≤ 0.009 PFU's/mL, or ≤ 0.008 PFU's/mL. In alternative embodiments, the infectivity of the VZV is ≤ 0.007 PFU's/mL, ≤ 0.006 PFU's/mL, ≤ 0.005 PFU's/mL, ≤ 0.004 PFU's/mL or ≤ 0.003 PFU's/mL. In additional alternative embodiments, the infectivity is ≤ 0.002 PFU's/mL or ≤ 0.001 PFU's/mL.

In some embodiments of the compositions and methods provided herein, the infectivity (PFU's) of the sample is determined using a varicella plaque assay such as the assay described in Example 1 and further described in Krah *et al.* (*J. Virol. Methods* (1990) 27: 319-26). One skilled in the art will realize that other methods are also useful for determining infectivity of the VZV sample or composition and may be used in place of the varicella plaque assay.

Any VZV strain can be used in the compositions and methods described herein, including a wild type varicella strain, or an attenuated strain such as the Oka strain, as described in U.S. Patent 3,985,615 and available from the American Type Culture Collection (Accession no. VR-795TM, ATCC, Manassas, VA). The Oka strain was originally obtained from a healthy boy with a natural varicella infection and passaged in human embryonic lung cells. It is adapted to growth in guinea pig embryo cell cultures and human diploid lung fibroblast cell cultures (e. g., MRC-5 cells). In preferred embodiments of the compositions and methods described herein, the VZV is an Oka strain or an Oka strain derivative, such as the Oka/Merck VZV strain. An "Oka strain derivative," as used herein, is a strain that is obtained by a process of further passaging the Oka strain in an appropriate cell type in order to sufficiently attenuate the strain so as to be useful, for example, as a live attenuated vaccine. In the methods and compositions of the invention described herein, a live or attenuated VZV, such as the Oka strain or derivative thereof, is inactivated with gamma radiation prior to administration to a patient.

Also provided herein is a method of preparing an inactivated VZV comprising gamma irradiating a sample comprising a VZV using from about 5 to about 50 kGy of gamma radiation. In preferred embodiments of this aspect of the invention, gamma radiation is provided to the sample by exposing the sample to ⁶⁰Co rays. In particular embodiments of this aspect of the invention, the amount of gamma radiation is as discussed, *supra*.

The invention also provides an inactivated VZV produced or obtainable by the methods described herein. Additionally provided is a vaccine comprising a therapeutically effective amount of the inactivated VZV produced by the methods described herein and a pharmaceutically acceptable carrier.

The invention also provides, in one aspect, a method for the treatment, prevention of, immunization against, or reduction in the likelihood of herpes zoster and/or other disease or complication associated with the reactivation of VZV, e.g., post-herpetic neuralgia, in a patient, the method comprising administering to the patient a therapeutically effective amount of a vaccine or pharmaceutical composition comprising an inactivated VZV and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the VZV is inactivated with gamma irradiation. Since VZV reactivation correlates with a decline in cell-mediated immunity, the methods of treatment herein are useful to boost the cell-mediated immune response in a patient that was previously exposed to varicella through natural infection or vaccination, but whose immune response has declined as a result of advancing age and/or immune system dysfunction.

In the methods of treatment/immunization described above, the pharmaceutical composition comprising an inactivated VZV may be administered to the patient through any suitable route including, but not limited to: subcutaneous injection, intradermal introduction, impression through the skin, or other modes of administration such as, intravenous,

intramuscular or inhalation delivery. In preferred embodiments of the methods described herein, the mode of administration is subcutaneous or intramuscular.

The methods and compositions described above are useful for preventing HZ and/or PHN, or reducing the severity or duration thereof in immunocompetent and immunocompromised patient populations including, but not limited to, healthy patients and immunocompromised patients who have undergone hematopoietic stem cell transplant (HCT) or solid organ transplant (SOT), HIV-infected patients, patients with autoimmune diseases, individuals with blood cancers; individuals receiving chemotherapy across a broad range of solid tumors malignancies; patients receiving chronic immunosuppressive therapy across a broad range of conditions including rheumatoid arthritis (RA), systemic lupus (SLE), Crohn's disease, psoriasis, and multiple sclerosis. In some embodiments of the methods described herein, the inactivated VZV vaccine is administered to a patient who is at greater risk for HZ due to disease, for example, the diseases mentioned above, or treatment for disease (such as hematologic malignancies, solid tumor malignancies or chemotherapy, autoimmune diseases).

In some embodiments of any of the methods and compositions described above, the patient is 50 years of age or older and may be healthy or immunocompromised. In other embodiments, the patient is 55 years of age or older, 60 years of age or older, 65 years of age or older, 70 years of age or older, or 75 years of age or older. In alternative embodiments, the patient is from about 50 to about 55 years of age, from about 55 to about 60 years of age, from about 60 to about 65 years of age, or from about 65 to 70 years of age.

In additional embodiments of the methods described herein, the vaccine or pharmaceutical composition is administered concominantly with other commonly administered 'standard of care' therapies; or with other vaccines for targeted patient populations, including, for example, a pneumococcal vaccine such as PNEUMOVAX™ 23 (PN23, Merck & Co., Inc.) a hepatitis B (HBV) vaccine such as RECOMBIVAX™ HB or ENGERIX-B™ (GlaxoSmithKline Biologicals) and flu vaccines.

In specific embodiments of the methods of treatment/prevention provided herein, the method further comprises allowing an appropriate predetermined amount of time to pass and administering to the patient one or more additional doses of the pharmaceutical composition. In said embodiments, one additional dose may be administered to the patient after an appropriate amount of time has passed, alternatively, two, three or four additional doses, each being administered after an appropriate amount of time has passed. In an exemplary embodiment, 3 or 4 doses are administered to the patient as part of a dosing regimen that is properly separated over a course of time. One skilled in the art will realize that the amount of time between doses may vary depending on the patient population, dosage of the vaccine and/or patient compliance. In an exemplary embodiment, a time period of about 3 weeks, about 1 month, about 6 weeks, about 2 months, or about 3 months or more is allowed to

pass between administrations of each dose to the patient. In one specific embodiment the vaccine is administered to a patient that is to undergo a transplant before the transplant, e.g. 3 weeks, 1 month or 2 months, pre-transplant, and an additional one or more doses are given to the patient at an appropriate time after the transplant, e.g. 3 weeks, 1 month or 2 months post-transplant, with a predetermined amount of time passing between each dose.

All publications mentioned herein are incorporated by reference for the purpose of describing and disclosing methodologies and materials that might be used in connection with the present invention. Nothing herein is to be construed as an admission that the invention is not entitled to antedate such disclosure by virtue of prior invention.

Having described preferred embodiments of the invention with reference to the accompanying drawings, it is to be understood that the invention is not limited to those precise embodiments, and that various changes and modifications may be effected therein by one skilled in the art without departing from the scope or spirit of the invention as defined in the appended claims.

The following examples illustrate, but do not limit the invention.

Materials and Methods

EXAMPLE 1

Varicella Plaque Assay

The infectivity titers of varicella zoster virus (VZV) preparations were measured using the liquid overlay procedure described by Krah *et al.* (*J. Virol Methods* (1990) 27: 319-326). The assay was performed as follows: MRC-5 (human diploid lung fibroblast) cells were seeded in 60-mm tissue culture plates at 600,000 cells in 5 mL volumes of BME (Basal Medium Eagle with Hanks' balanced salts solution) with 100 mg/L galactose, 50 ug/mL neomycin, 2 mM L-glutamine, and were incubated at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ in a $5\% \pm 1\%$ CO_2 humidified atmosphere. After incubating for 24-56 hours, the cells reached 50-80% confluency and were used for the plaque assay. The cell growth medium was removed by aspiration, and the cells were infected with 100 μL aliquots of VZV solution diluted in appropriate diluent, such as PGS stabilizer (PBS with sucrose and hydrolyzed gelatin).

Virus was allowed to attach for ≥ 1 hour at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ in a $5\% \pm 1\%$ CO_2 humidified atmosphere. The cultures were then overlaid with 5 mL volumes of maintenance medium (Minimal Essential Medium with Earle's salts (MEM), 2% heat-inactivated fetal calf serum, 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ neomycin and 2 mM L-glutamine), and returned to incubation at $35 \pm 1^\circ\text{C}$ in a $5\% \pm 1\%$ CO_2 humidified atmosphere for 6-7 days for plaque development. Medium was then aspirated from the plates and plaques were visualized by staining cells with a solution of 0.2% (w/v) Coomassie Blue R-250 in ethanol, 1% acetic acid. Plaque counts were the average of 3-5 replicate plates, and were multiplied by the dilution factor (the reciprocal of the

corresponding dilution of virus tested) and the inoculum volume correction factor (10, to adjust from 0.1 mL to 1 mL) to provide plaque-forming units/mL (PFU/mL).

Given the critical need to assure the absence of false-positive PFU results for inactivated samples (where a plaque-like spot may appear in the cell monolayer used for the plaque assay due to inadvertent scratching of the monolayer or due to the presence of a clump of cells), an immunostaining method was developed and applied to verify that foci that were counted as plaques were indeed VZV-infected foci of cells (VZV plaques). Briefly, following the staining with Coomassie Blue in the standard plaque assay, cultures with visible plaques were incubated with a polyclonal anti-VZV serum diluted in PBS, 0.05% Tween 20 and incubated for 1 hour at 35°C. Cells were washed with PBS, 0.05% Tween 20 to remove unbound antibody and bound antibody was detected using a peroxidase-conjugated goat anti-human IgG antibody and a peroxidase substrate (diaminobenzidine solution) that develops a precipitate when reacted with peroxidase. A brown precipitate developed around the foci containing the VZV, and no additional plaques beyond those observed using the Coomassie Blue stain were detected. Therefore this immunostaining method, using a combination of anti-VZV primary serum, peroxidase-conjugated anti-primary species antibody and peroxidase substrate, provides a method to verify whether a suspected plaque in an inactivated sample is indeed represents residual infectious VZV.

EXAMPLE 2

Competitive VZV Antigen ELISA and Direct Binding VZV Antigen ELISA Assays

Two antigen assay formats were used to characterize and quantify VZV antigen. A competitive antigen ELISA, which mimics the test used to estimate VZV antigen in VZV commercial product and utilizes a single polyclonal serum to detect VZV antigen, was used in select studies. To provide additional characterization of the reactivity of VZV antigen following gamma irradiation or other inactivation treatments, a direct binding ELISA was developed and applied, wherein the test sample was directly adsorbed to microtiter ELISA plates and then detected using monoclonal or polyclonal antibodies.

Competitive ELISA for Quantitation of VZV Antigen

Briefly, this assay was conducted by incubation of VZV antigen from test samples with a fixed amount of polyclonal anti-VZV serum in solution. Remaining free antibody (not bound to antigen) was allowed to bind to a standard VZV antigen immobilized on ELISA microtiter plates. The amount of antibody capable of binding to the plates is inversely proportional to the amount of antigen in the test sample. Antibody binding to the plates was quantitated by reaction with an enzyme-linked anti-human antibody and appropriate substrate to provide a colored product which was quantitated spectrophotometrically.

The test procedure comprised the following steps: (1) ELISA plates were coated with glycoproteins (gps) from VZV-infected or uninfected MRC-5 cells, and were overcoated with 1% (w/v) bovine serum albumin to reduce non-specific antibody adsorption to the plates. (2) Test VZV antigens were diluted in PGS stabilizer in polypropylene microtubes. A VZV antigen preparation of known antigen titer was included as a control. Samples were typically diluted through serial 1:1.25-fold dilutions to include antigen concentrations ranging from 2.6 to 0.9 antigen units/mL. The dilution series of the VZV standard was used to generate a standard curve for the measurement of antigen in the test samples. (3) A human anti-VZV serum was diluted in PGS stabilizer to two-times the desired final dilution (4) Three hundred μ L volumes of diluted antigen were dispensed into polypropylene microtubes, mixed with 300 μ L of diluted anti-VZV serum and incubated at 35-37°C for 15-30 min. The anti-VZV serum plus diluent (no antigen) was used as a control. (5) Aliquots of 100 μ L from each serum-antigen mixture (and control) were added to 2 replicate VZV gp coated wells and 2 MRC-5 gp coated wells. (6) Plates were incubated for 15-30 min at 35-37°C to allow free antibody (not complexed to test antigen in solution) to bind to the gp antigen immobilized on the plates. (7) Unbound antibody was removed by washing and wells received an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-human IgG antibody solution to detect bound human antibody. (8) After incubation for 15-30 min at 35-37°C, unbound conjugate was removed by washing. Bound conjugate was detected by incubation for 10-15 min at 35-37°C with p-nitrophenyl phosphate substrate. (9) After termination of the substrate reaction by addition of 50 μ L 3 M NaOH, color development (OD at 405 nm) was quantitated using a microplate spectrophotometer.

Test calculation and interpretation comprised the following steps: (1) Respective replicate OD values for the replicate VZV and MRC-5 gp coated wells were averaged. It was known from experience that the MRC-5 OD is consistent between different samples and dilutions. Therefore, the MRC-5 gp OD values for the entire set tested were typically averaged and used to correct for non-specific binding of the primary antibody (the anti-VZV serum). The averaged MRC-5 gp OD was subtracted from the respective averaged VZV gp ODs to provide VZV specific (Δ OD) values. (2) Generation of a standard curve for measurement of antigen amounts: The standard curve Δ OD values were plotted against the known antigen concentrations (VZV antigen units/mL). The data were entered into an appropriate graphics program, the linear portion of the curve was identified and the "line fit formula" ($y=a+bx$) for this linear curve was obtained. (3) Calculation of antigen amounts of test samples: Because values for a and b are given by the line-fit formula, and y (Δ OD) is known, the unknown value, x, representing the units/mL antigen, could then be calculated and corrected by the sample dilution to obtain the antigen concentration of the original (undiluted) test sample. The reported antigen concentration is that obtained with the least diluted sample providing a Δ OD value within the linear portion of the standard curve.

Direct Binding VZV Antigen ELISA

Briefly, this assay was conducted by incubation of dilutions of VZV antigen from test samples in 96-well microtiter plates to immobilize the antigen, followed by detection of the bound antigen with monoclonal or polyclonal anti-VZV antibodies. Bound anti-VZV antibodies were quantitated by reaction with an enzyme-linked anti-appropriate-species antibody and appropriate substrate to provide a colored product which was quantitated spectrophotometrically. Titration curves of OD versus dilution for the samples were then compared (quantitated as the fold-dilution difference between titration curves ("curve shift").

The test procedure comprised the following steps: (1) High-binding ELISA plates were coated with 200µl antigen (vaccine) diluted in PBS 1:20 through 1:2560 in serial 2-fold dilutions. The plates were covered and stored @ 2-8°C overnight. (2) Liquid from step #1 was poured off and plates were rinsed 3 times with PBS + 0.05% Tween 20. The final rinse was removed and diluted antibody (100 µl/well) was added. Plates were incubated for 1 hour @ 35 °C. (3) Liquid from step #2 was poured off and the plates were rinsed 3 times with PBS + 0.05% Tween 20. The final rinse was removed and diluted conjugate (100 µl/well) was added. Plates were incubated for 1 hour @ 35°C. (4) Liquid from step #3 was poured off and the plates were rinsed 3 times with PBS + 0.05% Tween 20. The final rinse was removed and substrate (undiluted) was added. Plates were then incubated for 30min @ 35°C. (5) The reaction was stopped with NaOH. (6) Optical density (OD) was determined by reading the plate at 405nm.

Antibodies used for this experiment were as follows: EPP serum and purified monoclonal antibodies to gE (Biodesign catalog # mab8612), gB (Chemicon catalog #C05102M, Millipore Corp., Billerica, MA), and gH (Biodesign cat#C05104M and Virusys catalog #VA033-100, Virusys Corp., Taneytown, MD). Conjugates used were either anti-human IgG (BioSource catalog # AHI0305, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) or goat anti-mouse IgG (Pierce catalog # 31322, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL). Alkaline phosphatase pNPP (Sigma cat#p7988, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO) 100mL was used as substrate.

EXAMPLE 3

VZV IFN γ ELISPOT Assay

Briefly, serial dilutions of test antigens, ranging from 1 to 0.125 VZV antigen units/mL, were incubated with PBMC from 6 donors in duplicate wells. Following incubation, the cells responding to VZV antigen were identified by their ability to produce interferon gamma. Interferon gamma production was detected using mouse anti-interferon gamma coated on a microtiter plate, and a matched secondary anti-mouse IgG enzyme conjugated antibody

and substrate, leading to detection of precipitated substrate around the interferon gamma producing cells ("spots"). The number of spot forming cells (SFC: those that form spots indicating interferon gamma secretion) was quantitated by an automated ELISPOT reader, and results were expressed as SFC per 10^6 PBMC.

5

Results

EXAMPLE 4

Inactivation Kinetics of Gamma Irradiated VZV.

We had previously tested heat treatment as a method of inactivating lyophilized VZV for use as a vaccine for immunocompromised patients, but found that this method resulted in residual infectivity of the viral preparation (see below). It was considered that this residual infectivity was not an optimum characteristic of the "inactivated" vaccine. More extensive inactivation of liquid bulk vaccine was achieved relative to lyophilized vaccine, but heat-treatment of bulk vaccine was determined to not provide an optimum manufacturing process. Thus, an alternate inactivation method for varicella-zoster virus vaccine (Oka/Merck) lyophilized using gamma irradiation ^{60}Co was investigated to see if a more extensive inactivation of infectivity (yielding a more favorable safer profile) method than heat treatment could be identified. The goals of this evaluation were first to determine if more extensive inactivation of infectivity could be achieved by ^{60}Co irradiation, and then secondly, whether the antigen properties achieved following gamma irradiation differed from those of heat-treated material and were acceptable for clinical application studies. VZV vials were irradiated using ~1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 kGy (2007) or 0.45, 1.35, and 2.7 kGy. Irradiation was performed using a ^{60}Co Gammacell® irradiator (Best Theratronics Ltd. Corporation, Ottawa, Ontario, Canada).

The residual PFU/mL of each vial per dose of radiation (Gy) was determined using the varicella plaque assay in MRC-5 cells. The log PFU/mL was plotted against the dose of radiation and the data points showed a linear regression of inactivation (FIGURE 1). Following the kinetic study, we tested 100 mL of inactivated VZV vaccine irradiated with ^{60}Co rays to 12kGy (inactivated lyophilized) to permit extended confirmation of the extent of inactivation (by testing a larger total volume). Zero plaques were detected in the 100 mL sample.

Additionally, ^{60}Co rays were used to irradiate VZV bulk. The bulk was thawed and aliquoted in PETG bottles for irradiation at 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6 kGy (FIGURE 2). The irradiated bulk was analyzed for residual infectivity in a varicella plaque assay using MRC-5 cells. Zero plaques were detected in the 100 mL samples of irradiated bulk (6 kGy). Linear inactivation kinetics were observed by plotting the log pfu/mL titer against radiation time.

EXAMPLE 5

Evaluation of Immunogenicity by VZV IFN γ ELISPOT Assay

To evaluate the impact of different inactivation methods on immunogenicity, a VZV IFN γ ELISPOT assay was performed as described in Example 3 using 6 donor peripheral blood mononuclear cell (PBMC) samples. This study was conducted to determine if the IFN- γ response diminishes after VZV is inactivated under different conditions. Five heat-treated VZV bulk preparations were tested, along with two gamma-irradiated VZV bulk preparations. The heat treated VZV preparations consisted of samples that were treated under the following conditions: (1) 40°C for 24 hours, (2) 45°C for 3.5 hours, (3) 45°C for 4.5 hours, (4) 56°C for 30 minutes, and (5) 56°C for 90 minutes. The gamma-irradiated samples consisted of VZV bulks gamma-irradiated for 3 or 4 hours at 5.92 kGy. Live (untreated) VZV samples from the same bulk preparations as those used above to create inactivated samples were also tested for comparison.

A lot of VZV that was inactivated by treatment with UV light was also included as an ELISPOT antigen (VZV lot # 96.07) as an assay run control along with PHA (positive control) and media (negative control). All antigens were evaluated across a serial two-fold dilution from 1:40 to 1:320. One assay run was performed testing 6 PBMC samples, chosen to represent a range of VZV response levels.

The resulting VZV spot counts (SFC/10⁶ PBMC) are shown in Figures 3A-F. There was no evidence suggesting a difference in VZV response for the inactivated antigen preparations compared with the untreated antigen preparation among the donors tested. There was also no evidence of a significant interaction between preparation (treatment) and response at particular dilution levels. Relative to the live VZV preparation, fold differences in ELISPOT counts for the 8 inactivated VZV preparations, including original VZV Lot #96.07, ranged from 1.15-fold lower (56°C for 90 minutes) to 1.14-fold higher (40°C for 24 hours; Lot #96.07) relative to the live VZV preparation. Relative to the live VZV preparation, none of the 8 inactivated VZV preparations yielded statistically significantly lower ELISPOT counts across the donors tested.

Thus, human ELISPOT testing showed no significant difference in responses using PBMC from a panel of donors, for VZV preparations inactivated by different procedures (40°C, 45°C, 56°C heat-treatment or gamma irradiation of bulk).

EXAMPLE 6

Electron Microscopy Analysis of Inactivated VZV Vaccine

EM analyses of heat-treated and gamma irradiated bulks and lyophilized vaccine were performed to provide an additional characterization of the effects of inactivation on inactivated VZV preparations. The analysis method selected was cryo-transmission electron

microscopy (cryo-TEM) in vitreous ice to best preserve virus integrity during the EM analysis. Cryo-TEM was performed by NanoImaging Services, Inc (San Diego, CA).

Inactivated VZV samples were prepared for EM analysis to evaluate the effects of inactivation on particle integrity/appearance. Lyophilized samples were rehydrated with 700 μ L of sterile distilled water and were not further diluted prior to imaging. Samples were preserved in a thin film of vitreous ice supported on a 2.0x0.5 μ m C-Flat holey carbon film (Protochips, Inc., Raleigh, NC) on 400 mesh copper grids. Grids were cleaned immediately prior to use in a Solarus plasma cleaner (10 seconds, 25% O₂, 75% Ar). All samples were prepared by applying a drop (~3 μ L) of the sample suspension to the plasma cleaned grid, blotting away with filter paper and immediately processing with vitrification in liquid ethane, using an FEI Vitrobot™ (4C, 95% RH). Grids were stored under liquid nitrogen until transferred to the electron microscope for imaging. Electron microscopy was performed using an FEI Tecnai™ T12 electron microscope (FEI Company, Hillsboro, OR), operating at 120 KeV equipped with an FEI Eagle™ 4K x 4K CC camera (FEI Company). Images of each grid were acquired at multiple scales to assess overall distribution of the specimen. After identifying target areas for imaging at lower magnifications, pairs of higher magnification images were acquired.

Samples were evaluated using a NanoImaging Systems instrument (21K-52K magnification). Untreated lyophilized VZV, lyophilized VZV heat-treated for 77 days at 56°C, and lyophilized VZV irradiated to 25 or 50 kGy using a ⁶⁰Co source were compared.

Cryo EM results indicate potential particle effects at high gamma irradiation doses, with a reduction in electron density (perhaps reflecting degradation of viral DNA), but no significant effect of overall particle and protein appearance for lyophilized samples. However, lyophilization may protect from these changes as lyophilized inactivated samples showed a loss of electron density, but particles remained intact at higher doses. (See Figure 4).

EXAMPLE 7

Determination of Antigen Reactivity

VZV Ag ELISA assays were performed to determine the antigen (Ag) content of heat or gamma-irradiation inactivated bulk samples or gamma irradiated lyophilized VZV, using a human polyclonal serum and monoclonal antibodies (mAb) to VZV gB, gH, gE as detecting antibodies. Gamma irradiated bulk or lyophilized samples showed no change in antigen reactivity. However, samples heat-treated at 56°C for 90 minutes showed a change in antigen reactivity with the polyclonal, gE and gH monoclonal antibodies.

Additional VZV bulk samples were gamma irradiated at 25kGy and 50kGy to support the use of 50 kGy as an upper exposure for terminal sterilization. These samples were

tested in a direct binding antigen ELISA assay to polyclonal anti-VZV serum and mAb to gpE, gB, and gH.

Gamma irradiation of lyophilized VZV vaccine to sterilizing conditions (25-50 kGy) did not detectably affect ELISA reactivity of the antigen with polyclonal serum or gE or gB monoclonal antibodies. Results using the gH mAb were inconclusive due to high background staining. An increased background signal with this monoclonal antibody (and not those to gE or gB) was also observed using an alternate ELISA plate (Maxisorp).

EXAMPLE 8

Mouse Immunogenicity

A mouse immunogenicity study was performed to evaluate a set of inactivated VZV (iVZV) preparations generated using various methods for inactivation. Serum samples generated from the study were evaluated in the VZV ELISA assay to determine the relative titer of antibodies to VZV generated by the different inactivated VZV formulations. Two different VZV bulk preparations were generated and evaluated: (1) VZV bulk, heat-treated at 56°C for 90 minutes, and (2) VZV bulk, gamma irradiated with 5,924.7 Grays (Gy) for 3 hours. Two different VZV lyophilized vaccine preparations were also generated and evaluated: (1) VZV Vaccine Lyophilized, heat-treated at 56°C for 50 days, and (2) VZV vaccine lyophilized, gamma irradiated with 25,000 Gy. Live (untreated) VZV bulk and live (untreated) VZV lyophilized vaccine were evaluated for comparison with the iVZV bulk preparations.

BALB/c mice (n=16 for each group) were immunized intraperitoneal (i.p.) with 4.5 VZV antigen units (U)/mouse (9U/mL) on days 0, 14 and 29. Bleeds (sera) were collected on day -1 (pre-bleed) and on days 13, 28 and 43. Day 28 sera (14 days post dose 2) were evaluated in the VZV ELISA for IgG response.

The adjusted VZV titers (VZV titer minus MRC-5 titer) are shown in Figure 5. Pre-bleed sera were tested with the corresponding group from day 28 to determine a titer cut-off for MRC-5 and VZV. Wells of ELISA plates were coated with UV-treated VZV or MRC-5 extract, and then incubated with dilution of the test mouse sera to quantify the relative amounts of antibodies specific for VZV in the mouse sera.

Results indicate that the IgG titer of heat-treated bulk was on average 5.57 fold lower (95% CI = (3.45, 8.99)) and the IgG titer of gamma-irradiated bulk was on average 2.43 fold lower (95% CI = (1.51, 3.93)) relative to untreated bulk. Heat-treated lyophilized titer was on average 1.38 fold lower (95% CI = (1.00, 1.90)) and gamma-irradiated lyophilized titer was on average 1.66 fold lower (95% CI = (1.22, 2.26)) than the untreated lyophilized virus.

Antibody titer with gamma-irradiated bulk was 2.29-fold higher (95% CI = (1.54, 3.41)) on average than the titer obtained following immunization with the heat-treated bulk. Antibody titer with gamma-irradiated lyophilized virus was 1.20-fold lower (95% CI = (0.89, 1.61)) on

average than the titer obtained following immunization with the heat-treated lyophilized preparation. The overall data support gamma irradiation of lyophilized virus as having least impact on immunogenicity in this model.

Results show that antibody (IgG) responses were reduced in mice following immunization with 2 doses of the inactivated preparations compared with the untreated bulks.

EXAMPLE 9

Administration of inactivated VZV vaccine to healthy patients aged 50-59.

A gamma -irradiated VZV vaccine was administered to healthy adults 50-to-59 years of age in a randomized, double-blind, 2-part, multicenter study, which was designed to evaluate the safety, tolerability, and immunogenicity of the vaccine. The purpose of this study was to study the safety, tolerability and immunogenicity of vaccine lots inactivated by gamma-irradiation or heat-treatment methods.

A total of 161 healthy individuals 50 to 59 years of age were randomized 2:2:1 to receive either gamma-irradiated VZV vaccine "A", inactivated at 16 to 25 kGy (n=65), heat-treated VZV vaccine (n=63), or placebo (n=33) given as a 4-dose regimen. Each dose was administered approximately 30 days apart. The heat-treated vaccine and the gamma-irradiated vaccine "A" were derived from independent bulk lots but were controlled by targeting similar antigen content.

The primary hypothesis was that gamma-irradiated VZV vaccine (A) inactivated at a level of 16 to 25 kGy would elicit an acceptable VZV-specific immune response as measured by gpELISA at 28 days Postdose 4. The secondary hypothesis was that heat-treated VZV vaccine would elicit an acceptable VZV-specific immune response as measured by gpELISA at 28 days Postdose 4. The statistical criterion for success corresponds to the lower bound of the two-sided 95% confidence interval on the geometric mean fold rise (GMFR) in the heat-treated VZV vaccine recipients being >1.0 . The immunogenicity results among vaccine recipients in this study are provided in Figure 6.

Results indicate that the success criteria for testing the primary and secondary hypotheses were met, i.e., gamma-irradiated VZV vaccine A and heat-treated VZV vaccine were immunogenic when administered to healthy individuals. Both vaccine groups had safety profiles similar to that of the placebo group.

EXAMPLE 10

Administration of VZV vaccine lots inactivated with different levels of gamma irradiation to healthy volunteers aged 50 to 59.

A second study was conducted to provide clinical data on vaccine lots inactivated with a broader range of gamma irradiation. In this study, a total of 129 healthy individuals 50 to 59 years of age were randomized 1:1 to receive either gamma-irradiated VZV vaccine "B", irradiated at 16 to 25 kGy (n=64) or gamma-irradiated VZV vaccine "C", irradiated at 25 to 50 kGy (n=65) given as a 4-dose regimen, each dose administered approximately 30 days apart. Vaccine lots B & C utilized in this study were derived from the same bulk lot and same fill/formulation with identical VZV antigen content but were inactivated at different gamma-irradiation levels.

The first primary hypothesis of this study was that gamma-irradiated VZV vaccine (C) inactivated at a level of 25 to 50 kGy would elicit an acceptable VZV-specific immune response as measured by gpELISA at 28 days Postdose 4. The second primary hypothesis was that gamma-irradiated VZV vaccine (B) inactivated at a level of 16 to 25 kGy and matched for antigen content with the vaccine inactivated at 25 to 50 kGy will elicit an acceptable VZV-specific immune response as measured by gpELISA at 28 days Postdose 4. The statistical criteria of success for each hypothesis correspond to the lower bound of the two-sided 95% confidence interval on the GMFR in the gamma-irradiated vaccine recipients being >1.0. The immunogenicity results among vaccine recipients in this study are provided in Figure 7.

Results of this study indicate that the success criteria for testing the primary hypotheses were met, i.e., gamma-irradiated VZV vaccine B (gamma-irradiated 16-25 kGy) and gamma-irradiated VZV vaccine C (gamma-irradiated 25-50 kGy) were immunogenic when administered to healthy individuals. Both vaccine groups had similar safety profiles.

Results of this study also indicate that there was an imbalance of the baseline geometric mean titer (GMT); group B baseline GMT was ~313, group C baseline GMT was ~429. Although the fold rise differences were not significant, the difference in baseline titers may account for the fold rise differences observed in the trial. In addition, the analytical data indicates the higher gamma-irradiation dose (>25 kGy) results in a higher antigen degradation.

WHAT IS CLAIMED IS:

1. An inactivated varicella zoster virus (VZV), wherein the infectivity of the VZV is undetectable and wherein the inactivated VZV induces an immune response against VZV when administered to a patient.

2. A pharmaceutical composition comprising a therapeutically effective amount of the VZV of claim 1 and a pharmaceutically acceptable carrier

3. The pharmaceutical composition of claim 2, wherein the infectivity of the inactivated VZV is ≤ 0.040 plaque-forming units (PFU's)/mL.

4. The pharmaceutical composition of claim 3, wherein the infectivity of the inactivated VZV is ≤ 0.010 plaque-forming units (PFU's)/mL

5. The pharmaceutical composition of claim 4, wherein the infectivity of the inactivated VZV is ≤ 0.002 plaque-forming units (PFU's)/mL

6. The pharmaceutical composition of any of claims 2-5, wherein the VZV strain is an Oka strain or an Oka strain derivative.

7. The pharmaceutical composition of claim 6, wherein the composition is lyophilized.

8. The pharmaceutical composition of claim 7, wherein the VZV is inactivated by gamma irradiation.

9. The pharmaceutical composition of claim 8, wherein the immune response elicited by the composition is not significantly different than the immune response elicited by a control sample comprising the same amount of the VZV that has not been inactivated.

10. The pharmaceutical composition of claim 9, wherein the immune response elicited by the inactivated VZV differs from the immune response elicited by the control sample by 25% or less.

11. The pharmaceutical composition of any of claims 2-5, wherein the infectivity of the VZV is determined by a varicella plaque assay.

12. A method of preparing an inactivated varicella zoster virus (VZV) comprising gamma irradiating a sample comprising a VZV using from about 5 to about 50 kGy of gamma radiation.

13. The method of claim 12, wherein the gamma radiation is provided to the sample by exposing the sample to ^{60}Co rays.

14. The method of claim 13, wherein the VZV is the Oka strain or an Oka strain derivative.

15. The method of claim 13, wherein the sample is lyophilized prior to being irradiated.

16. The method of claim 14 or claim 15, wherein the amount of gamma radiation used is about 25 kGy or less.

17. The method of claim 16, wherein the vaccine is a liquid bulk formulation and the amount of gamma radiation used is from about 5 kGy to about 12.5 kGy.

18. The method of claim 15, wherein the amount of gamma radiation used is from about 10 kGy to about 25 kGy.

19. An inactivated VZV produced or obtainable by the method of any of claims 12-18.

20. A vaccine comprising a therapeutically effective amount of the inactivated VZV of claim 19 and a pharmaceutically acceptable carrier.

21. A method for the treatment of herpes zoster in a subject, the method comprising administering to the subject a pharmaceutical composition which comprises a therapeutically effective amount of an inactivated varicella zoster virus (VZV) and a pharmaceutically acceptable carrier, wherein the VZV is inactivated with gamma irradiation.

22. The method of claim 21, wherein the route of administration of the pharmaceutical composition is subcutaneous or intramuscular.

23. The method of claim 22, wherein the subject is 50 years of age or older.

5

24. The method of claim 22 or 23, wherein the subject is immunocompromised.

10

25. The method of claim 24, wherein the subject has at least one condition selected from the group consisting of: suffering from a hematologic malignancy, undergoing an immunosuppressive therapy, received a hematopoietic stem cell transplant, received a solid organ transplant, infected with HIV, and suffering from an autoimmune disease.

15

26. The method of claim 22 or 23, wherein the method further comprises allowing a predetermined amount of time to pass, and administering to the subject one or more doses of the pharmaceutical composition.

1/10

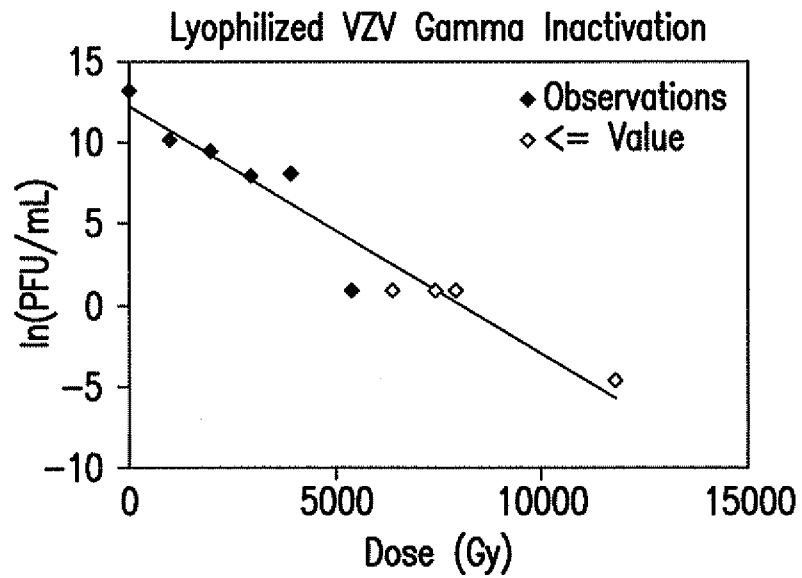


FIG.1

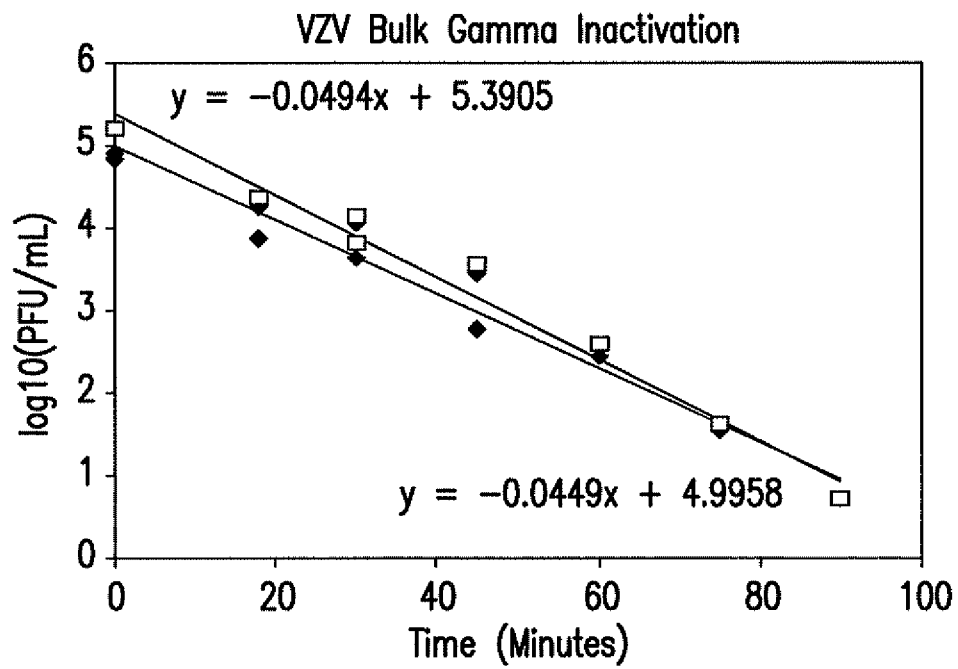


FIG.2

2/10

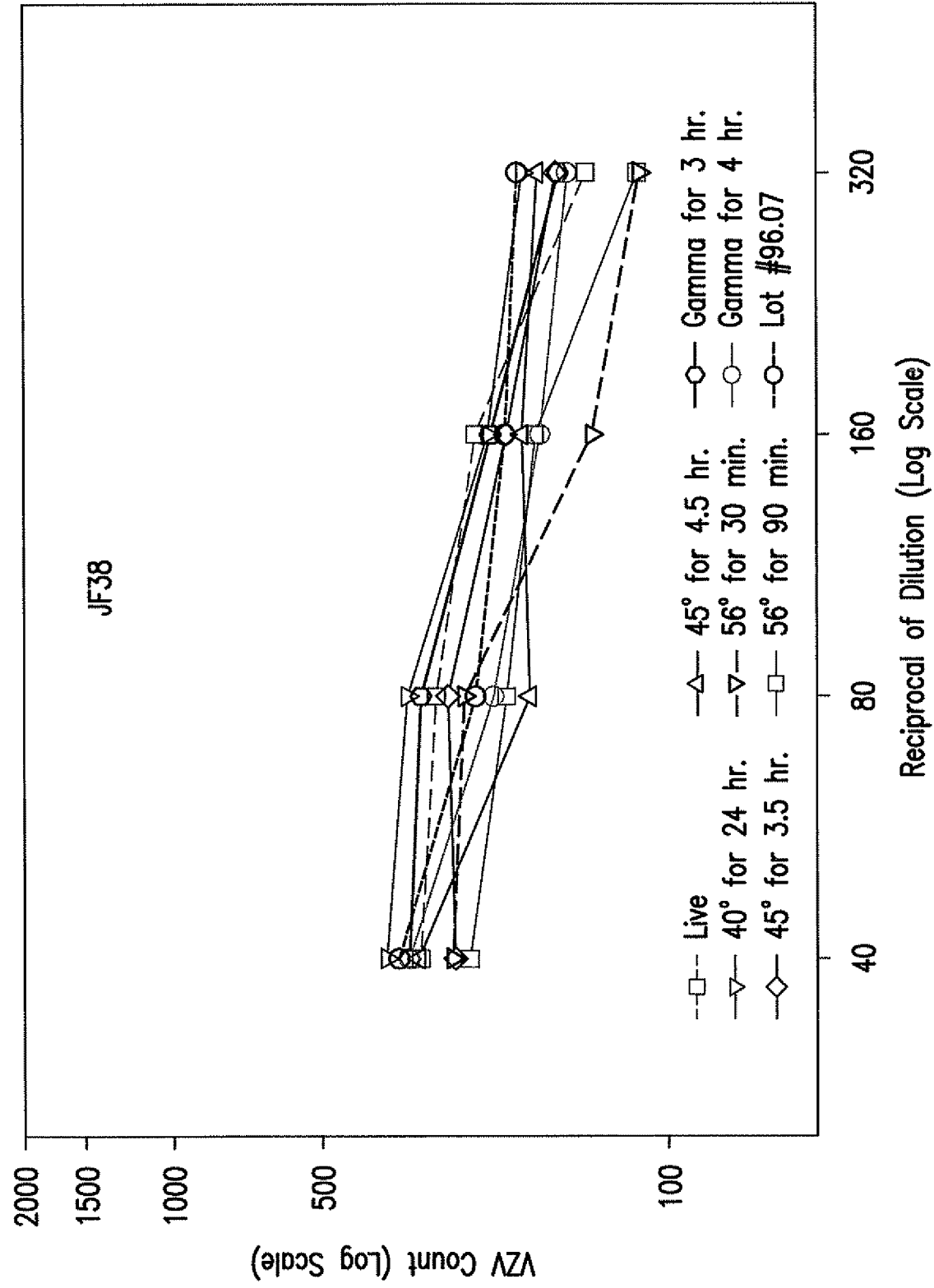


FIG. 3A

3/10

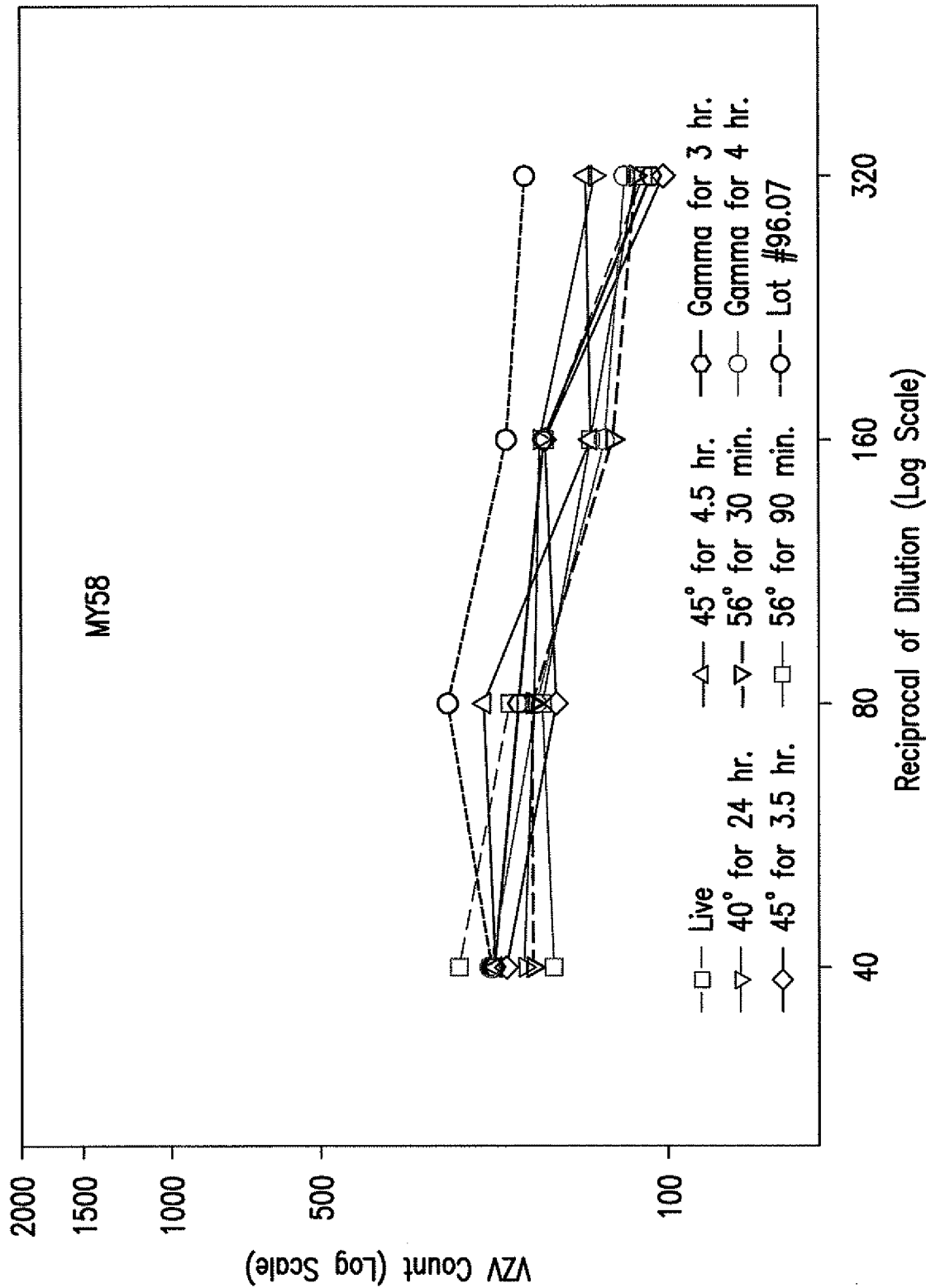


FIG.3B

4/10

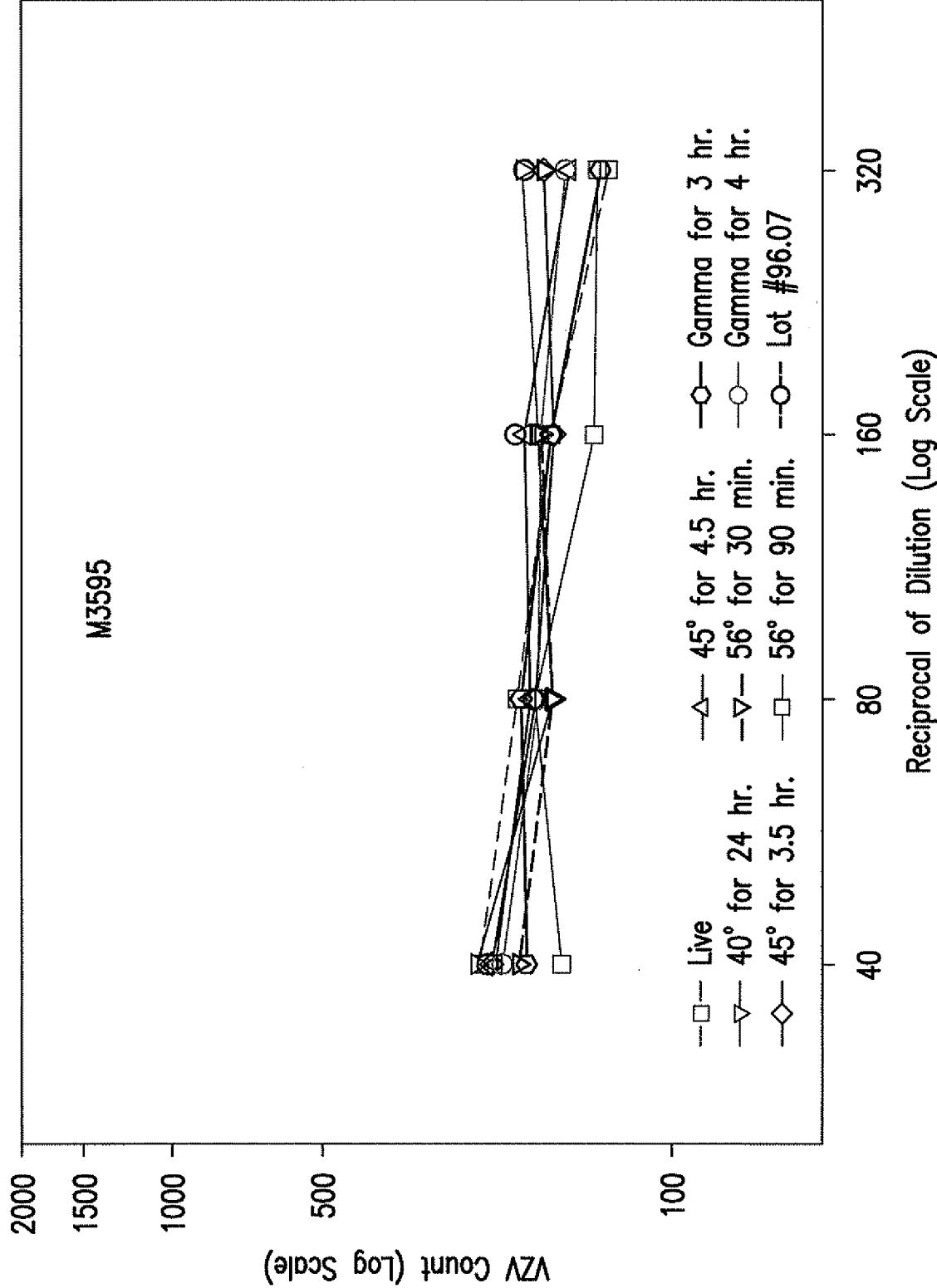


FIG.3C

5/10

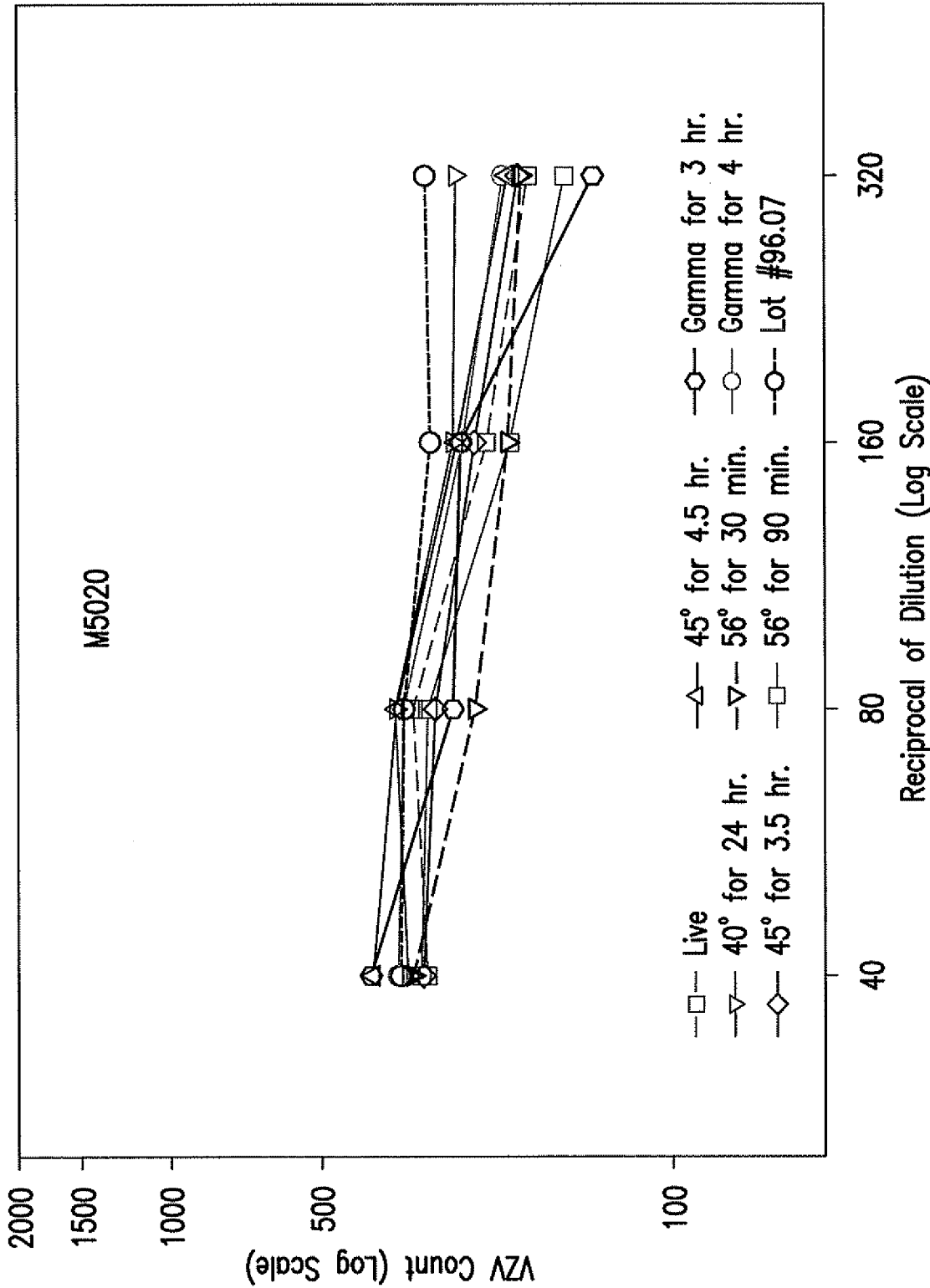


FIG.3D

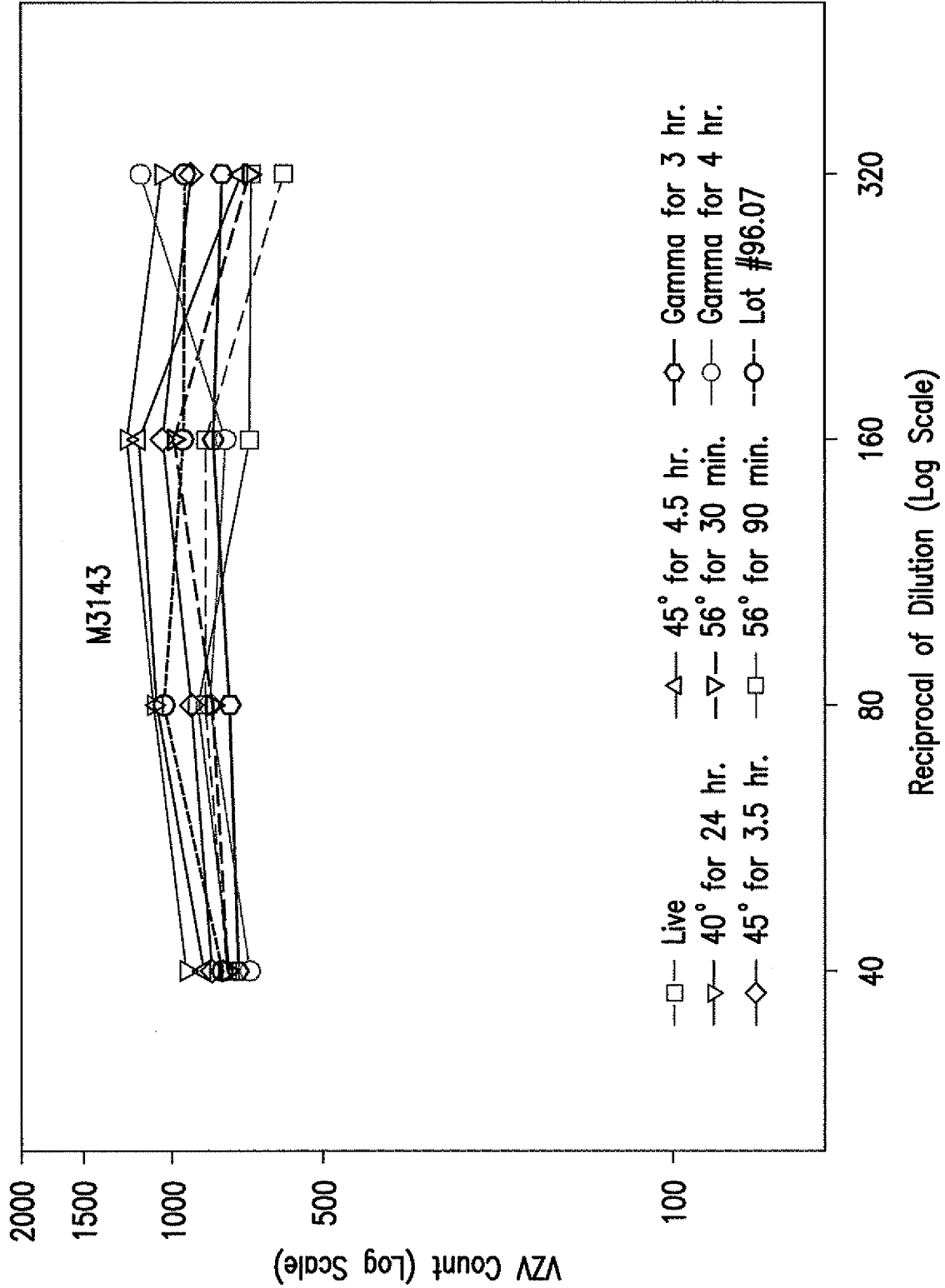


FIG.3E

7/10

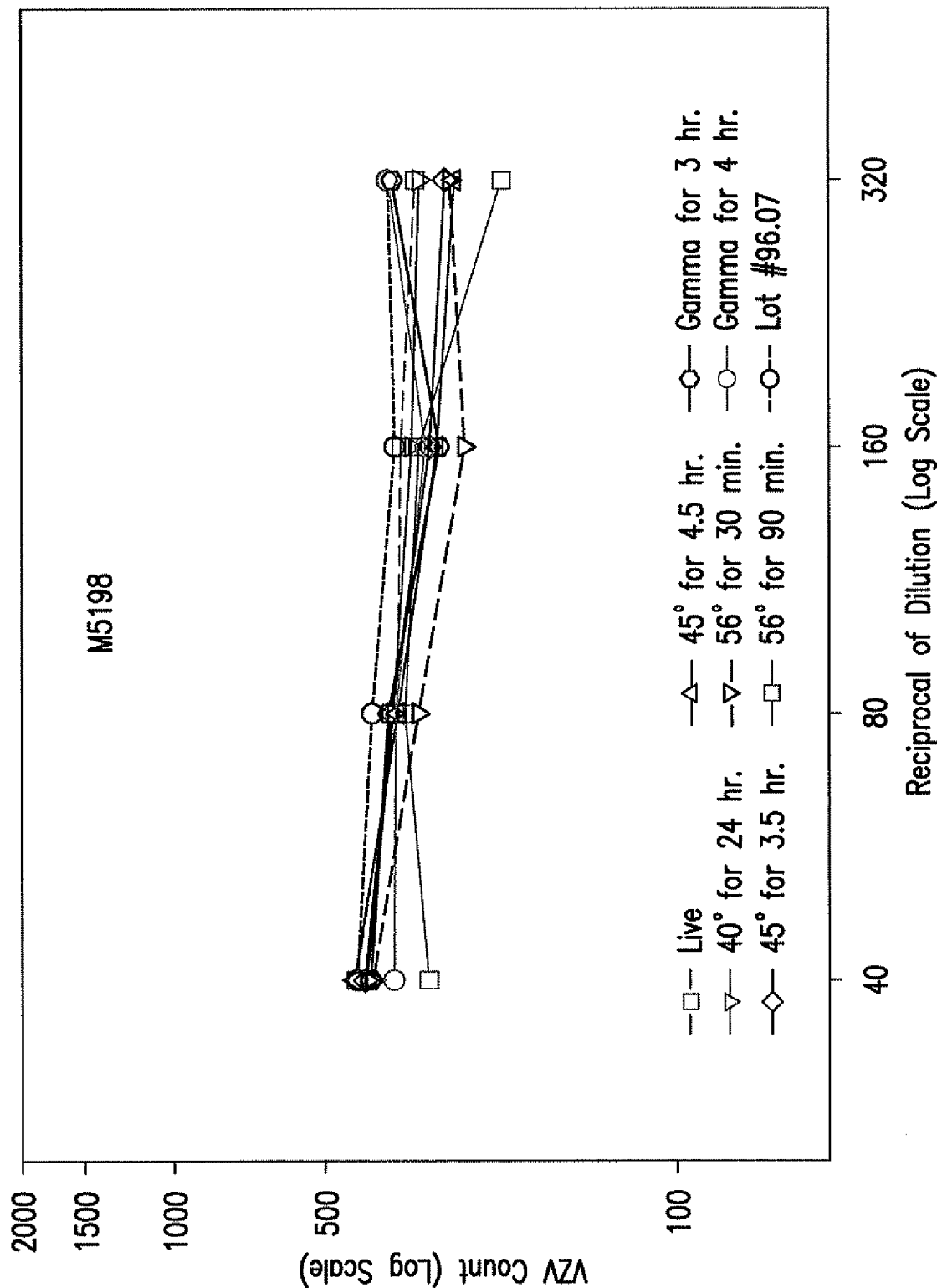


FIG. 3F

8/10

Cryo TEM analysis of Lyophilized VZV

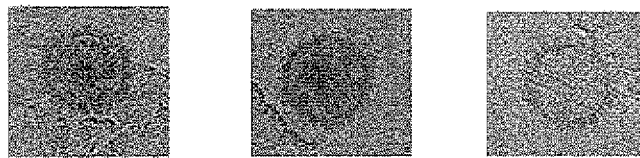


FIG.4A FIG.4B FIG.4C

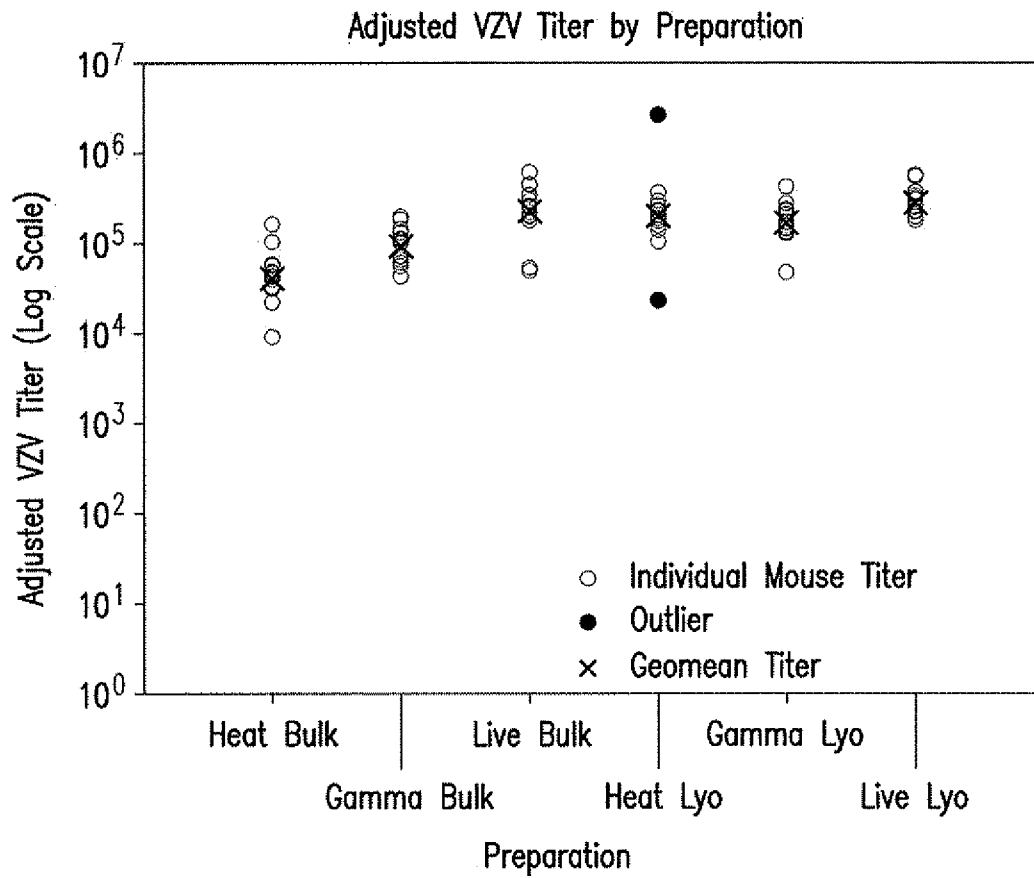


FIG.5

9/10

Endpoint	Heat-Treated VZV Vaccine (N=65)				Gamma-irradiated VZV Vaccine A (N=63)			
	n	Estimated Response [†]	(95% CI) [†]	p-Value	n	Estimated Response [†]	(95% CI) [†]	p-Value
21-35 Days Post Dose 1								
GMT	62	484.36	(372.10, 630.47)		59	524.74	(410.80, 670.30)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	62	1.67	(1.38, 2.03)		59	1.72	(1.48, 2.00)	
21-35 Days Post Dose 2								
GMT	62	560.77	(436.73, 720.04)		59	598.98	(474.93, 755.42)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	62	1.94	(1.61, 2.34)		59	1.96	(1.62, 2.37)	
21-35 Days Post Dose 3								
GMT	62	585.72	(474.47, 723.06)		59	689.98	(543.82, 875.43)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	62	2.02	(1.68, 2.43)		59	2.26	(1.89, 2.69)	
21-35 Days Post Dose 4								
GMT	62	608.67	(492.50, 752.25)		59	666.27	(532.81, 833.16)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	62	2.10	(1.78, 2.48)	<0.0001	59	2.18	(1.82, 2.61)	<0.0001
[†] Calculated based on longitudinal regression model (adjusting for pre-vaccination immunogenicity level in the presence of incomplete data), with visit as covariate. The model was fitted in each vaccine group separately. N = Number of subjects vaccinated in each group n = Number of subjects contributing to this immunogenicity analysis (having valid results at baseline and the time points post baseline). gpELISA = Glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay. GMT = Geometric Mean Titer; CI = Confidence interval; VZV = Varicella-zoster virus								

FIG.6

10/10

Endpoint	Gamma-irradiated VZV Vaccine B (N=64)				Gamma-irradiated VZV Vaccine C (N=65)			
	n	Estimated Response [†]	(95% CI) [†]	p-Value	n	Estimated Response [†]	(95% CI) [†]	p-Value
21-35 Days Post Dose 1								
GMT	59	599.04	(465.53, 770.84)		63	646.12	(507.55, 822.52)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	59	1.91	(1.58, 2.32)		63	1.50	(1.29, 1.75)	
21-35 Days Post Dose 2								
GMT	59	638.49	(505.07, 807.15)		63	712.55	(571.77, 888.00)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	59	2.04	(1.69, 2.46)		63	1.66	(1.44, 1.92)	
21-35 Days Post Dose 3								
GMT	59	566.13	(454.64, 704.95)		63	601.06	(483.71, 746.88)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	59	1.81	(1.48, 2.21)		63	1.40	(1.21, 1.62)	
21-35 Days Post Dose 4								
GMT	59	594.03	(479.90, 735.32)		63	676.64	(544.98, 840.10)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	59	1.90	(1.57, 2.29)	<0.0001	63	1.58	(1.35, 1.84)	<0.0001

[†] Calculated based on longitudinal regression model (adjusting for pre-vaccination immunogenicity level in the presence of incomplete data), with visit as covariate. The model was fitted in each vaccine group separately.
N = Number of subjects vaccinated in each group.
n = Number of subjects contributing to this immunogenicity analysis (having valid results at baseline and the time points post baseline).
gpELISA = Glycoprotein enzyme-linked immunosorbent assay.
GMT = Geometric Mean Titer.
CI = Confidence interval.
VZV = Varicella-zoster virus.

FIG.7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/46534

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/25; A61K 39/245; A61K 39/275; A61K 39/285; C12N 7/04 (2011.01)

USPC - 424/230.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8): A61K 39/25; A61K 39/245; A61K 39/275; A61K 39/285; C12N 7/04 (2011.01)

USPC: 424/230.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

IPC(8): C12N 7/04; A61K 39/275 (2011.01)

USPC: 435/236, 435/948, 424/232.1

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubWEST; PGPB, USPT, EPAB, JPAB, GoogleScholar, ScienceDirect, Dialog

Inactivated varicella zoster virus (VZV), plaque-forming units (PFU's), Oka strain or derivative, lyophilized, gamma irradiation, 60Co, control, varicella plaque assay, treatment of herpes zoster/shingles, subcutaneous or intramuscular, immunocompromised, booster etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 6,214,354 B1 (CALANDRA et al.) 10 April 2001 (10.04.2001) col 3, ln 15-31, ln 50-60, col 4, ln 15-20, col 4, ln 25-35, col 8, ln 40-45, col 9, ln 45-67, col 10, ln 1-7, col 11, ln 45-55, col 12, ln 1-20, col 12, ln 64-67, col 15, ln 43-46	21-26 ----- 1-20
Y	Martin et al. Comparison of the immunological responses and efficacy of gamma-irradiated V3526 vaccine formulations against subcutaneous and aerosol challenge with Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB. Vaccine 28:1031-1040; 13 November 2009 (13.11.2009) Abstract, page 1034, Table 1	1-11
Y	Degiori et al. Cryo-gamma radiation inactivation of bovine herpesvirus type-1. Radiation Physics and Chemistry 55 (1999) 469-471 Abstract, page 470, col 2	12-20
Y	US 2001/0018440 A1 (CHU et al.) 20 August 2001 (30.08.2001) para[0141]	11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 November 2011 (30.11.2011)

Date of mailing of the international search report

14 DEC 2011

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300
PCT OSP: 571-272-7774

TÍTULO DE LA INVENCION

VACUNAS DE VIRUS VARICELA ZÓSTER INACTIVADO, MÉTODOS DE PRODUCCIÓN Y USO DE LAS MISMAS

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se refiere a composiciones y métodos para la prevención y tratamiento del herpes zóster. Más específicamente, la invención se refiere a composiciones de vacuna que comprenden una vacuna de virus varicela (VVZ) inactivado y a métodos para producir dichas composiciones.

10

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La infección primaria con virus varicela zóster (VVZ) produce varicela, normalmente en niños y adultos jóvenes. Aunque las manifestaciones clínicas de la varicela típicamente se resuelven sin intervención médica en un corto periodo de tiempo, el VVZ
15 puede permanecer latente en neuronas sensoriales durante muchos años después de la infección. La reactivación y replicación del VVZ latente, a menudo décadas después, puede producir herpes zóster (HZ), comúnmente conocido como herpes, una erupción dolorosa que generalmente se limita a un solo dermatoma. Dicha reactivación de VVZ se correlaciona con una reducción en la inmunidad mediana por células, que se produce en
20 ancianos o en personas que están inmunocomprometidas (Weinberg *et al.*, *Journal of Infectious Diseases* (2009) 200: 1068-77). En algunos pacientes, el dolor asociado con HZ puede persistir durante meses o incluso años después de que se haya curado la erupción de HZ, una complicación denominada neuralgia postherpética (NPH).

Actualmente se dispone de una vacuna atenuada viva (ZOSTAVAX®,
25 Merck & Co., Inc., Whitehouse Station, NJ) para la prevención del herpes zóster en pacientes sanos de edad avanzada (Patentes de Estados Unidos N° 6.214.354 y 5.997.880). Esta vacuna tiene reducidos notablemente los impactos adversos del HZ en poblaciones de pacientes inmunocompetentes (Oxman, MN, *Clin Infect Dis.* (2010) 51(2):197-213; Sanford y Keating, *Drugs Aging* (2010) 27(2):159-76; Oxman et al., *N. Engl. J. Med.* (2005) 352:
30 2271-83). Sin embargo, las vacunas atenuadas vivas pueden no ser adecuadas para pacientes inmunocomprometidos.

Los individuos inmunocomprometidos, incluyendo pacientes que padecen malignidades hematológicas, pacientes sometidos a terapias inmunosupresoras, pacientes que han recibido un trasplante de células madre hematopoyéticas (TCM) o un trasplante de
35 órganos sólidos (TOS), pacientes infectados con VIH y pacientes con enfermedades autoinmunes, tienen una mayor incidencia de desarrollo de HZ en relación con la población general. Además, estas poblaciones de pacientes tienen un mayor riesgo de desarrollar complicaciones graves y que ponen en peligro la vida (Gourishankar *et al.* (2004) *Am J*

- Transplant* 4: 108-115, Ragozzino et al. (1982) *Medicine (Baltimore)* 61: 310-316, Wung et al. (2005) *Am J Med* 118: 1416.e9-1416.e18, Dworkin & Schmader (2003) *Clinical Infectious Diseases* 36: 877-882, Gebo et al. (2005) *J Acquir Immune Defic Syndr* 40: 169-174, Mattiuzzi et al. (2003) *Clinical Cancer Research* 9: 976-980, Dworkin et al. (2003)
- 5 *Neurology* 60: 1274-1283.) tales como meningoencefalitis (Tauro et al. (2000) *Bone Marrow Transplant* 26: 795-796), mielitis transversa, deterioro visual (Walton et al. (1999) *Bone Marrow Transplant* 23: 1317-1320), neumonitis (Wacker et al. (1989) *Bone Marrow Transplant* 4: 191-194), hepatitis (Rogers et al. (1995) *Bone Marrow Transplant* 15: 805-807; Schiller et al. (1991) *Bone Marrow Transplant* 7: 489-491), superinfección bacteriana,
- 10 cicatrización cutánea y desfiguración (Schuchter et al. (1989) *Blood* 74: 1424-1427). A pesar de los altos riesgos de morbilidad y mortalidad asociados con HZ en individuos inmunocomprometidos, esta población no puede elegirse para la vacunación con una vacuna viva atenuada contra HZ tal como ZOSTAVAX®. Por lo tanto, existe una necesidad significativa de una vacuna que sea segura y eficaz en poblaciones de pacientes
- 15 inmunocomprometidos para prevenir HZ o reducir la gravedad o duración del HZ o las complicaciones asociadas.

Los problemas de seguridad relacionados con los pacientes inmunocomprometidos han llevado a los investigadores a investigar el uso de vacunas no replicativas contra patógenos virales tales como vacunas de subunidad, vacunas de

20 partículas similares a virus y vacunas enteras inactivadas. Muchas vacunas inactivadas aprobadas contienen virus que se inactivan usando formalina, incluyendo vacunas de hepatitis A, polio y encefalitis japonesa. En el caso del HZ, se ha sugerido que podría desarrollarse una vacuna más segura para sujetos inmunocomprometidos mediante la inactivación térmica del VVZ o mediante el uso de una vacuna de subunidad (Cohen, J.I.,

25 (2008) *J. Infect. Dis.* 197 (Suppl 2): S237-S241). Redman et al. (*J. Infectious Diseases* (1997) 176: 578-85) describen una vacuna de VVZ inactivado que se inactivó por calentamiento a 50°C, dando como resultado un contenido de virus infeccioso $\leq 1,2$ ufp/0,5 ml. Este nivel de infectividad no sería deseable para que un producto se administrara a pacientes inmunocomprometidos. Las Patentes de Estados Unidos N° 6.214.354 y 5.997.880

30 también mencionan el potencial del uso de una vacuna de VVZ inactivada y describen un ejemplo de la producción y ensayo de una vacuna tratada con calor.

Se satisfaría una necesidad médica significativa si se desarrollara un método para inactivar VVZ que diera como resultado una muestra de VVZ que fuera segura y eficaz en pacientes inmunocomprometidos, es decir, que careciera de infectividad residual pero

35 conservara la inmunogenicidad y antigenicidad de una muestra no inactivada.

SUMARIO DE LA INVENCION

En el presente documento se ha demostrado que una muestra de VVZ puede

inactivarse con irradiación gamma de forma que la infectividad del VVZ en la muestra esté a un nivel indetectable; sin embargo, no hay pérdida significativa de inmunogenicidad y/o antigenicidad y no se produce ningún cambio significativo en la estructura del VVZ tras la inactivación por los métodos descritos en el presente documento con respecto a una muestra de VVZ que no se haya inactivado.

En un aspecto, la invención proporciona un virus varicela zóster (VVZ) inactivado, donde la infectividad del VVZ es indetectable y donde el VVZ inactivado induce una respuesta inmune contra VZZ cuando se administra a un paciente. También se proporciona una composición farmacéutica/vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del VVZ inactivado y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Las composiciones de la invención son líquidas o están en un estado congelado, por ejemplo, liofilizado. En algunas realizaciones de las composiciones descritas en el presente documento, el VVZ se ha inactivado con radiación gamma.

En otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar una vacuna de VVZ inactivado, comprendiendo el método someter a irradiación gamma una muestra que comprende VVZ usando de aproximadamente 5 kGy a aproximadamente 50 kGy de radiación gamma. En realizaciones preferidas, la fuente de radiación gamma es ^{60}Co , aunque a este respecto también pueden ser útiles otros isótopos conocidos en la técnica. En algunas realizaciones del método de preparación desvelado en el presente documento, la muestra se liofiliza antes de la irradiación. En realizaciones alternativas, una masa líquida a granel se expone a la radiación gamma, sin liofilizarse primero.

La invención también proporciona un método de tratamiento o de inmunización frente a HZ u otra enfermedad asociada con la reactivación del VVZ, comprendiendo el método administrar a un sujeto una vacuna o composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un VVZ inactivado y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en el que el VVZ se inactiva por irradiación gamma. En algunas realizaciones de los métodos de tratamiento descritos en el presente documento, la vía de administración de la composición/vacuna es subcutánea o intramuscular. En realizaciones específicas de este aspecto de la invención, el paciente tiene 50 años o más y/o está inmunocomprometido.

Como se usa a lo largo de la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una”, “el” y “la” incluyen las referencias plurales a menos que el contexto dicte claramente otra cosa.

Como se usa a lo largo de la memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, se aplican las siguientes definiciones y abreviaturas:

El término “tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a medidas profilácticas o preventivas. Los individuos en necesidad de tratamiento incluyen los que ya tienen el trastorno así como los que son propensos a tener el trastorno o aquellos

en los que se desea prevenir el trastorno. El tratamiento de un paciente con el VVZ inactivado de la invención incluye uno o más de los siguientes: inducción/aumento de una respuesta inmune contra VVZ en el paciente, prevención, mejora, supresión o reducción de la probabilidad de reactivación de VVZ en pacientes que se han infectado con varicela o han recibido una vacuna de VVZ vivo, prevención o reducción de la probabilidad de desarrollar HZ y/u otra enfermedad o complicación asociada con la reactivación de VVZ tal como NPH, reducción de la gravedad o duración de HZ y/u otra enfermedad o complicación asociada con la reactivación de VVZ, tal como NPH.

La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” significa una composición de vacuna suficiente para producir un efecto deseado que incluye, pero sin limitación: inducción/aumento de una respuesta inmune contra VVZ en el paciente, prevención, mejora o supresión de la reactivación de VVZ en pacientes que se han infectado con varicela o han recibido una vacuna de VVZ vivo, prevención de HZ y/o NPH, reducción de la gravedad o duración de HZ y/o NPH. Un experto en la materia reconoce que este nivel puede variar.

La expresión “respuesta inmune” se refiere a una respuesta inmune mediada por células (células T) y/o una respuesta de anticuerpos (células B).

La expresión “paciente” se refiere a cualquier ser humano que va a recibir las vacunas de VVZ inactivado, o composiciones farmacéuticas, descritas en el presente documento, incluyendo tanto individuos inmunocompetentes como individuos inmunocomprometidos. Como se define en el presente documento, un “paciente” incluye los que ya se han infectado con VVZ, por infección natural o vacunación.

La expresión “a granel” se refiere a una formulación o composición líquida que comprende más de una dosis de vacuna.

La expresión “niveles indetectables”, haciendo referencia a la infectividad de una formulación o composición de vacuna particular, significa que la formulación o composición comprende $\leq 0,050$ unidades infecciosas o unidades formadoras de placas (“UFP”) de virus VVZ infeccioso por ml de muestra, preferiblemente $\leq 0,040$ UFP/ml, $\leq 0,030$ UFP/ml, $\leq 0,020$ UFP/ml, $\leq 0,015$ UFP/ml, $\leq 0,010$ UFP/ml, $\leq 0,009$ UFP/ml o $\leq 0,008$ UFP/ml, más preferiblemente $\leq 0,007$ UFP/ml, $\leq 0,006$ UFP/ml, $\leq 0,005$ UFP/ml, $\leq 0,004$ UFP/ml $\leq 0,003$ UFP/ml, más preferiblemente $\leq 0,002$ UFP/ml o $\leq 0,001$ UFP/ml. Las UFP de una muestra particular pueden determinarse usando, por ejemplo, un ensayo en placa de varicela tal como el ensayo descrito en el Ejemplo 1 y descrito adicionalmente en Krah *et al.* (*J. Virol. Methods* (1990) 27: 319-26). La infectividad de una muestra también puede confirmarse por un método de inmunotinción, como se describe en el Ejemplo 1.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 muestra la cinética de inactivación de VVZ liofilizado sometido a irradiación γ (log UFP/ml v. dosis de radiación véase el Ejemplo 4). Se irradiaron viales

de VVZ con diferentes niveles de rayos ^{60}Co usando un irradiador ^{60}Co Gammacell®. Las UFP residuales/ml de cada vial por dosis de radiación (Gy) se determinaron usando el ensayo en placas de varicela en células MRC-5. Los puntos de datos observados se muestran como rombos negros (“observaciones”) y los datos máximos medibles por el
 5 ensayo se muestran por rombos grises (“ $\leq$ Valor”).

La Figura 2 muestra la cinética de inactivación de la masa a granel de VVZ sometida a irradiación γ (log ufp/ml de título frente a tiempo de irradiación, véase el Ejemplo 4). Se usaron diferentes niveles de rayos ^{60}Co para irradiar la masa a granel de VVZ. La masa a granel irradiada se analizó con respecto a la infectividad residual en un
 10 ensayo en placas de varicela usando células MRC-5.

Las Figuras 3A-3F muestran la respuesta de VVZ (SFC/ 10^6 PBMC) después de inactivar a VVZ en diferentes condiciones, como se mide por el ensayo ELISPOT IFN γ de VVZ (véase el Ejemplo 5). Se muestran datos para muestras de PBMC de 6 donantes (figuras A-F) para cinco preparaciones de masa a granel de VVZ tratado térmicamente y
 15 dos preparaciones de masa a granel de VVZ sometido a irradiación gamma. También se muestran las respuestas de VVZ para muestras de VVZ vivo (no tratado) procedentes de las mismas preparaciones de masa a granel que se usaron anteriormente y un lote de VVZ que se inactivó por tratamiento con luz UV (VVZ, lote n° 96.07).

Las Figuras 4A-4C muestran imágenes de partículas virales de VVZ, evaluadas por crio-ME (véase el Ejemplo 6). Se presentan muestras liofilizadas que se dejaron sin tratar (Figura 4A), se irradiaron con 25 kGy (Figura 4B) o se irradiaron con 50 kGy (Figura 4C).

La Figura 5 muestra los resultados de un estudio de inmunogenicidad en ratón en el que se evaluó el título de VVZ (respuesta de IgG) para una serie de preparaciones de VVZ inactivado generadas usando diversos métodos de inactivación
 25 (véase el Ejemplo 8) en el ensayo ELISA de VVZ. Se muestran los títulos de VVZ ajustados (título de VVZ menos título de MRC-5) para cada ratón, junto con la media geométrica del título. También se muestran los resultados de 2 ratones del grupo liofilizado tratado con calor que se consideraron datos atípicos.

La Figura 6 muestra el análisis estadístico de respuestas de anticuerpos gpELISA de VVZ por puntos de tiempo entre receptores de la vacuna humana que recibieron vacuna de VVZ tratado con calor (N = 65) o vacuna de VVZ sometido a irradiación gamma (N = 63) como se describe en el Ejemplo 9.

La Figura 7 muestra el análisis estadístico de respuestas de anticuerpos gpELISA de VVZ por puntos de tiempo entre receptores de la vacuna humana que recibieron vacuna B de VVZ sometido a irradiación gamma (16-25 kGy, N=64) o vacuna C
 35 sometida a irradiación gamma (25-50 kGy, N=65), como se describe en el Ejemplo 10.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En el presente documento se ha demostrado que una masa a granel o muestra de VVZ liofilizado puede inactivarse con irradiación gamma de forma que la infectividad del VVZ en la muestra tenga un nivel indetectable (por ejemplo, la infectividad de muestras de VVZ inactivado descritas en el presente documento fue $\leq 0,001$ UFP/ml). El VVZ inactivado producido por los métodos descritos en el presente documento puede formularse con un vehículo farmacéuticamente aceptable para producir una composición farmacéutica o vacuna para uso en métodos de tratamiento/inmunización de la invención. No hay una pérdida significativa de inmunogenicidad y/o antigenicidad y tampoco un cambio significativo en la estructura del VVZ tras la inactivación por los métodos descritos en el presente documento con respecto a una muestra de VVZ que no se ha inactivado. De esta manera, cuando las composiciones farmacéuticas de la invención se administran a un paciente, la respuesta inmune inducida por la composición no es significativamente diferente de la respuesta inmune inducida por una muestra de control que comprende la misma cantidad del VVZ que no se ha inactivado. Como se usa en el presente documento, una respuesta inmune inducida por una muestra inactivada que “no es significativamente diferente” de una muestra de control no inactivada difiere de la muestra de control aproximadamente en un 50% menos, más preferiblemente aproximadamente un 40% o menos, aproximadamente un 30% o menos, e incluso más preferiblemente aproximadamente un 20% o menos, un 15% o menos, un 10% o menos o un 5% o menos.

La respuesta inmune inducida por una muestra activada y una muestra de control puede medirse en un modelo animal apropiado o en una población humana en un ensayo clínico, por ejemplo, midiendo uno o más de los siguientes parámetros: (1) la frecuencia de células que responden de forma específica al VVZ (como se describe en Calandra *et al.*, documento WO 94/002596, (2) las células T citotóxicas (CTL) anti-VVZ, o células CD8⁺ específicas de VVZ, (3) las células T auxiliares anti-VVZ o células CD4⁺ específicas de VVZ, (4) el nivel de anticuerpos específicos anti-VVZ o (5) el nivel de linfocinas tales como interferón, o interleucina.

En este campo se conocen técnicas que son útiles para medir la respuesta inmune e incluyen, pero sin limitación: un ensayo de respuesta de células T, un ensayo de potencia, un ensayo ELISPOT IFN γ de VVZ y un ensayo ELISA.

Para determinar la suficiencia de la respuesta inmune inducida por las vacunas/composiciones farmacéuticas de la presente invención y fabricadas por los métodos descritos en el presente documento, y también la eficacia de la vacuna inactivada, puede ser útil medir resultados clínicos en un ensayo clínico de voluntarios/sujetos humanos para medir, por ejemplo, una reducción de la duración o gravedad de HZ y/o una reducción de la duración de NPH en un individuo en un periodo menor de un mes después del desarrollo de zóster, la reducción en la incidencia de zóster en la población de pacientes, en un nivel

estadístico, por debajo de la incidencia encontrada en la población general o en individuos inmunocomprometidos o con riesgo de forma similar.

Como se ha indicado anteriormente, la presente invención muestra que las preparaciones de VVZ pueden inactivarse hasta niveles indetectables, mientras que aún
 5 conservan la antigenicidad e inmunogenicidad de un VVZ no inactivado similar. Por consiguiente, un aspecto de la invención proporciona un VVZ inactivado, donde la infectividad del VVZ es indetectable y donde el VVZ inactivado induce una respuesta inmune contra VVZ cuando se administra a un paciente.

Un experto en la materia puede determinar fácilmente una cantidad
 10 apropiada de antígeno de VVZ a usar como cantidad terapéuticamente eficaz de VVZ. Dicha cantidad variará de acuerdo con el uso deseado, u otros factores tales como la población de pacientes particular. En algunas realizaciones de los métodos y composiciones descritas en el presente documento, la cantidad de VVZ es de aproximadamente 1 a
 15 aproximadamente 10 unidades de antígeno de VVZ/dosis, siendo 1 unidad de antígeno de VVZ aproximadamente equivalente a 1 µg de proteína de VVZ purificada. En realizaciones específicas, la cantidad de antígeno de VVZ presente en una composición está comprendida entre aproximadamente 2 y aproximadamente 8 unidades de Ag de VVZ/dosis o entre
 20 aproximadamente 3 y aproximadamente 6 unidades de Ag de VVZ/dosis. La cantidad de antígeno puede determinarse con un ensayo de antígeno apropiado, por ejemplo, el ELISA competitivo descrito en el Ejemplo 2 del presente documento. Un experto en la materia puede determinar otros ensayos apropiados para medir la cantidad de antígeno en una muestra.

En el presente documento también se proporciona una composición
 25 farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del VVZ inactivado descrito anteriormente y un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables útiles en las composiciones de la invención incluyen cualquier agente compatible que no sea tóxico para los pacientes a las dosificaciones y concentraciones empleadas, tales como agua, solución salina, dextrosa, glicerol, etanol, tampones y similares, y combinaciones de los mismos. El vehículo también
 30 puede contener componentes adicionales tales como un estabilizante, un solubilizante, un modificador de la tonicidad, tal como NaCl, MgCl₂ o CaCl₂ etc., un tensioactivo y mezclas de los mismos.

La invención también proporciona composiciones multidosis que contienen más de una dosis del VVZ inactivado, un conservante antimicrobiano, que previene la
 35 contaminación microbiana involuntaria tras la introducción de una jeringa en el vial que comprende la composición, y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones multidosis pueden proporcionarse a un paciente más de una vez, después de que haya transcurrido un periodo de tiempo predeterminado, o a más de un paciente.

En algunas realizaciones de la invención, la composición es una masa líquida a granel que contiene más de una dosis de VVZ inactivado. En realizaciones alternativas, la composición está liofilizada. En la técnica se conocen métodos de liofilización. También se incluye en la invención una formulación liofilizada que se reconstituye con un diluyente
 5 apropiado tal como agua estéril para inyección o agua bacteriostática para inyección.

Comúnmente se usa irradiación gamma para esterilizar dispositivos y equipos para uso en aplicaciones médicas. También se usa para destruir cualquier patógeno potencial en productos biológicos tales como productos sanguíneos y preparaciones de anticuerpos. Para estos usos, un organismo se inactiva sin tener en cuenta el mantenimiento
 10 de la función del organismo. Existen fuentes bibliográficas limitadas que describen la inactivación de virus por irradiación gamma.

Rosen *et al.* (*Int. J. Radiat. Biol.* 52:795-804 (1987)) evaluaron en partículas intactas del virus herpes simplex la supervivencia de la capacidad de formación de placas y evaluaron en genomas purificados el daño en moléculas de ADN después del tratamiento
 15 con rayos ^{60}Co . Este estudio no evaluó la antigenicidad o inmunogenicidad del virus después de la irradiación. Otro estudio por Elliott *et al.* evaluó la inactivación de virus de Lassa, Marburg y Ebola usando rayos ^{60}Co . Se observaron cinéticas de inactivación lineales para los virus de Lassa, Ebola y Marburg y se consiguió la inactivación del virus por irradiación gamma usando rayos ^{60}Co . Elliott *et al.* observaron que, en estado congelado, se
 20 necesitaba una mayor dosis de radiación para la inactivación del virus que en estado líquido. Al igual que Rosen *et al.*, este estudio no pudo determinar la antigenicidad o inmunogenicidad de los virus después de la irradiación gamma. Alsharifi *et al.* (documento WO 2010/012045) describen el uso de irradiación gamma para inactivar el virus de la gripe, un virus de ARN de la familia Orthomyxoviridae, para uso como una vacuna.

En la invención descrita en el presente documento se muestra que la radiación gamma puede reducir la infectividad de una preparación viral de VVZ hasta niveles indetectables, mientras que conserva la antigenicidad, inmunogenicidad y características estructurales de un control no inactivado. De esta manera, en realizaciones preferidas de la invención, el VVZ se inactiva por irradiación gamma, que puede
 30 administrarse al VVZ por exposición a un isótopo apropiado tal como ^{60}Co , $^{137}\text{Cesio}$, $^{99}\text{Tecnecio}$ o $^{99\text{m}}\text{Tc}$. En realizaciones preferidas, la radiación gamma se administra al VVZ por exposición a rayos ^{60}Co .

La cantidad de radiación gamma útil para inactivar el VVZ es de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kiloGrays (kGy) de radiación gamma. Un Gray (Gy) es una unidad estándar de dosis absorbida, siendo igual un gray a una dosis absorbida
 35 de 1 Julio/kg (100 rads). Un experto en la materia se dará cuenta de que la cantidad de radiación expuesta a la muestra y la cantidad de tiempo deben variar para alcanzar una dosis absorbida deseada de radiación (dosis = fluencia x tiempo). Un experto en la materia

también podrá variar la cantidad de radiación a la que se expone la muestra dependiendo del tamaño del recipiente dentro del cual se está almacenando la muestra de forma que la dosis apropiada de radiación se administre a la muestra entera sin un exceso de exposición de una parte de la muestra, por ejemplo, la parte más próxima a la fuente radiactiva.

5 En algunas realizaciones de los métodos y composiciones de la invención descritos en el presente documento, la cantidad de radiación gamma usada para inactivar el VVZ es de aproximadamente 25 kGy o menor. En realizaciones alternativas, la cantidad de radiación gamma está en el intervalo de aproximadamente 5 kGy a aproximadamente 40 kGy, de aproximadamente 5 kGy a aproximadamente 35 kGy, de aproximadamente 5 kGy a
10 aproximadamente 30 kGy, de aproximadamente 5 kGy a aproximadamente 25 kGy, de aproximadamente 5 kGy a aproximadamente 20 kGy, de aproximadamente 5 kGy a aproximadamente 10 kGy, de aproximadamente 10 kGy a aproximadamente 50 kGy, de 10 kGy a aproximadamente 40 kGy, de aproximadamente 10 kGy a aproximadamente 35 kGy, de aproximadamente 10 kGy a aproximadamente 30 kGy, de aproximadamente 10 kGy a
15 aproximadamente 25 kGy, de aproximadamente 10 kGy a aproximadamente 20 kGy, de aproximadamente 15 kGy a aproximadamente 50 kGy, de aproximadamente 15 kGy a aproximadamente 40 kGy, de aproximadamente 15 kGy a aproximadamente 35 kGy, de aproximadamente 15 kGy a aproximadamente 30 kGy, de aproximadamente 15 kGy a aproximadamente 25 kGy, y de aproximadamente 15 kGy a aproximadamente 20 kGy.

20 La invención también proporciona una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente, y métodos para producir dicha composición, donde la composición es una masa líquida a granel y la cantidad de radiación gamma usada para inactivar el VVZ es de aproximadamente 5 kGy a aproximadamente 10 kGy, o de aproximadamente 5 kGy a aproximadamente 12,5 kGy. En otras realizaciones específicas, la composición se liofiliza
25 antes de la irradiación gamma y, en dicha realización, la cantidad de radiación gamma es de aproximadamente 5 kGy a aproximadamente 25 kGy o de aproximadamente 15 kGy a aproximadamente 25 kGy.

En el presente documento se muestra que se observaron cinéticas de inactivación lineales para VVZ inactivado con radiación gamma, que proporciona un efecto
30 beneficioso significativo al permitir el modelado de la inactivación, es decir, al estimar de forma fiable el nivel de infectividad residual en una muestra que comprende VVZ inactivado. Dicha cinética de inactivación lineal no se observó en el caso de VVZ inactivado por tratamiento con calor. Grieb *et al.* (*Biologicals* (2002) 30:207-216 and *Biomaterials* (2005) 26:2033-2042) describieron dos mecanismos específicos para la
35 inactivación de virus por irradiación gamma, que confirman la cinética de inactivación lineal observada para VVZ. El primer mecanismo es un “resultado directo de una energía de deposición de fotones en la diana”. Esta transferencia directa de energía da como resultado “la dislocación de electrones externos desde moléculas y la rotura de enlaces covalentes”. El

segundo mecanismo “indirecto” es el resultado de un ataque químico en radicales libres y especies de oxígeno reactivas típicamente generadas por la interacción de radiación con moléculas de agua y oxígeno. En realizaciones específicas de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el VVZ se liofiliza antes de la inactivación con

5 radiación gamma; de esta manera, es poco probable que exista mucha interacción con moléculas de agua porque el agua se retira del producto en el proceso de liofilización.

Redman *et al.* (*J. Infectious Diseases* (1997) 176: 578-85) describe una vacuna de VVZ inactivado que se inactivó por calentamiento a 50°C, dando como resultando un contenido de virus infeccioso $\leq 1,2$ ufp/0,5 ml. Se demostró que la vacuna
10 tratada con calor descrita por Redman y colaboradores reducía la gravedad de la enfermedad asociada con la reactivación de VVZ entre 24 pacientes programados para someterse a una infusión de células madre de sangre periférica o TMO (trasplante de médulas ósea) autólogo u otro TMO. Este nivel de infectividad no es adecuado para todos los pacientes, tales como los que están inmunocomprometidos. Además, los métodos de inactivación de VVZ que
15 usan tratamiento con calor requieren periodos de tiempo prolongados para alcanzar bajos niveles de infectividad, lo cual es ineficaz y no es eficaz en cuanto al coste.

Para este fin, la invención proporciona VVZ inactivado y composiciones farmacéuticas/vacunas que comprenden dicho VVZ inactivado, en las que la infectividad del VVZ está a un nivel indetectable, es decir, $\leq 0,050$ UFP/ml, siendo dichas
20 composiciones de VVZ inactivado más seguras que las vacunas descritas previamente para el tratamiento y/o prevención de HZ o una enfermedad asociada con la reactivación de VVZ y adecuadas para un proceso de fabricación más eficaz. Los VVZ inactivados de la presente invención conservan las características físicas estructurales, inmunogenicidad y antigenicidad de un control de VVZ no inactivado después de la inactivación. En algunas
25 realizaciones, la infectividad es $\leq 0,040$ UFP/ml, $\leq 0,030$ UFP/ml o $\leq 0,020$ UFP/ml. La invención también proporciona realizaciones en las que el número de unidades infecciosas es $\leq 0,015$ UFP/ml, $\leq 0,010$ UFP/ml, $\leq 0,009$ UFP/ml o $\leq 0,008$ UFP/ml. En realizaciones alternativas, la infectividad del VVZ es $\leq 0,007$ UFP/ml, $\leq 0,006$ UFP/ml, $\leq 0,005$ UFP/ml, $\leq 0,004$ UFP/ml o $\leq 0,003$ UFP/ml. En realizaciones alternativas adicionales, la infectividad
30 es $\leq 0,002$ UFP/ml o $\leq 0,001$ UFP/ml.

En algunas realizaciones de las composiciones y métodos proporcionados en el presente documento, la infectividad (UFP) de la muestra se determina usando un ensayo en placas de varicela tal como el ensayo descrito en el Ejemplo 1 y descrito adicionalmente en Krah *et al.* (*J. Virol Methods* (1990) 27: 319-26). Un experto en la materia se dará cuenta
35 de que otros métodos también son útiles para determinar la infectividad de la muestra o composición de VVZ y pueden usarse en lugar del ensayo en placas de varicela.

En las composiciones y métodos descritos en el presente documento puede usarse cualquier cepa de VVZ, incluyendo una cepa de varicela de tipo silvestre, o una cepa

atenuada tal como la cepa Oka, como se describe en la Patente de Estados Unidos 3.985.615 y disponible en la Colección Americana de Cultivos Tipo (Nº de Acceso VR -795™, ATCC, Manassas, VA). La cepa Oka se obtuvo originalmente a partir de un niño sano con una infección de varicela natural y se sometió a pases en células de pulmón embrionario humano. Está adaptada al crecimiento en cultivos de células embrionarias de cobaya y cultivos de fibroblastos diploides de pulmón humano (por ejemplo, células MRC-5). En realizaciones preferidas de las composiciones y métodos descritos en el presente documento, el VVZ es una cepa Oka o un derivado de cepa Oka, tal como la cepa de VVZ Oka/Merck. Un “derivado de cepa Oka”, como se usa en el presente documento, es una cepa que se obtiene por un proceso de pase adicional de la cepa Oka en un tipo celular apropiado para atenuar suficientemente la cepa de manera que sea útil, por ejemplo, como vacuna atenuada viva. En los métodos y composiciones de la invención descrita en el presente documento, un VVZ vivo o atenuado, tal como la cepa Oka o un derivado del mismo, se inactiva con radiación gamma antes de la administración a un paciente.

En el presente documento también se proporciona un método para preparar un VVZ inactivado que comprende someter a irradiación gamma una muestra que comprende un VVZ usando de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kGy de radiación gamma. En realizaciones preferidas de este aspecto de la invención, se proporciona radiación gamma a la muestra exponiendo la muestra a rayos ⁶⁰Co. En realizaciones particulares de este aspecto de la invención, la cantidad de radiación gamma es como se ha analizado anteriormente.

La invención también proporciona un VVZ inactivado producido o que puede obtenerse por los métodos descritos en el presente documento. Además se proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del VVZ inactivado producido por los métodos descritos en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

En un aspecto, la invención también proporciona un método para el tratamiento, prevención, inmunización contra o reducción de la probabilidad de herpes zóster y/u otra enfermedad o complicación asociada con la reactivación de VVZ, por ejemplo, neuralgia postherpética, en un paciente, comprendiendo el método administrar al paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de una vacuna o composición farmacéutica que comprende un VVZ inactivado y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el VVZ se inactiva con irradiación gamma. Como la reactivación del VVZ se correlaciona con una reducción en la inmunidad mediada por células, los métodos de tratamiento en el presente documento son útiles para reforzar la respuesta inmune mediada por células en un paciente que previamente se expuso a varicela por infección natural o vacunación, pero cuya respuesta inmune se ha reducido como resultado de una edad avanzada y/o una disfunción del sistema inmune.

En los métodos de tratamiento/inmunización descritos anteriormente, la composición farmacéutica que comprende un VVZ inactivado puede administrarse al paciente mediante cualquier vía adecuada, incluyendo pero sin limitación: inyección subcutánea, introducción intradérmica, impresión a través de la piel u otros modos de administración tales como administración intravenosa, intramuscular o inhalación. En realizaciones preferidas de los métodos descritos en el presente documento, el modo de administración es subcutáneo o intramuscular.

Los métodos y composiciones descritas anteriormente son útiles para prevenir HZ y/o NPH, o reducir la gravedad o duración de las mismas en poblaciones de pacientes inmunocompetentes e inmunocomprometidos que incluyen, pero sin limitación, pacientes sanos y pacientes inmunocomprometidos que se han sometido a trasplante de células madre hematopoyéticas (TCM) o un trasplante de órganos sólidos (TOS), pacientes infectados por VIH, pacientes con enfermedades autoinmunes, individuos con cánceres sanguíneos; individuos que reciben quimioterapia por una amplia serie de malignidades de tumores sólidos; pacientes que reciben terapia inmunosupresora crónica por una amplia serie de afecciones que incluyen artritis reumatoide (AR), lupus sistémico (LES), enfermedad de Crohn, psoriasis y esclerosis múltiple. En algunas realizaciones de los métodos descritos en el presente documento, la vacuna de VVZ inactivada se administra a un paciente que tiene un mayor riesgo de HZ debido a enfermedades, por ejemplo, las enfermedades mencionadas anteriormente, o para el tratamiento de enfermedades (tales como malignidades hematológicas, malignidades por tumores sólidos o quimioterapia, enfermedades autoinmunes).

En algunas realizaciones de cualquiera de los métodos y composiciones descritas anteriormente, el paciente tiene 50 años o más y puede estar sano o inmunocomprometido. En otras realizaciones, el paciente tiene 55 años o más, de 60 años o más, 65 años o más, 70 años o más o 75 años o más. En realizaciones alternativas, el paciente tiene de aproximadamente 50 a aproximadamente 55 años de edad, de aproximadamente 55 a aproximadamente 60 años de edad, de aproximadamente 60 a aproximadamente 65 años de edad o de aproximadamente 65 a 70 años de edad.

En realizaciones adicionales de los métodos descritos en el presente documento, la vacuna o composición farmacéutica se administra concomitantemente con otras terapias sanitarias administradas comúnmente; o con otras vacunas para poblaciones de pacientes diana, incluyendo, por ejemplo, una vacuna de neumococo tal como PNEUMOVAX™23 (PN23, Merck & Co., Inc.), una vacuna de hepatitis B (VHB) tal como RECOMBIVAX™ HB o ENGERIX-B™ (GlaxoSmithKline Biologicals) y vacunas para la gripe.

En realizaciones específicas de los métodos de tratamiento/prevenición proporcionados en el presente documento, el método comprende además dejar que pase un

periodo de tiempo predeterminado apropiado y administrar al paciente una o más dosis adicionales de la composición farmacéutica. En dichas realizaciones, puede administrarse una dosis adicional al paciente después de que haya transcurrido un periodo de tiempo apropiado y, como alternativa, pueden administrarse dos, tres o cuatro dosis adicionales, administrándose cada una después de que haya transcurrido un periodo de tiempo apropiado. En una realización ejemplar, se administran 3 o 4 dosis al paciente como parte de un régimen de dosificación que está separado de forma apropiada durante un trascurso de tiempo. Un experto en la materia se dará cuenta de que el periodo de tiempo entre dosis puede variar dependiendo de la población de pacientes, la dosificación de la vacuna y/o la adherencia a la terapia por parte del paciente. En una realización ejemplar, se deja que pase un periodo de tiempo de aproximadamente 3 semanas, aproximadamente 1 mes, aproximadamente 6 semanas, aproximadamente 2 meses o aproximadamente 3 meses o más entre las administraciones de cada dosis al paciente. En una realización específica, la vacuna se administra a un paciente que se va a someter a un trasplante antes del trasplante, por ejemplo, 3 semanas, 1 mes o 2 meses antes del trasplante, y se administra una dosis o más dosis adicionales al paciente después de que haya transcurrido un periodo apropiado desde el trasplante, por ejemplo 3 semanas, 1 mes o 2 meses desde el trasplante, transcurriendo un periodo de tiempo predeterminado entre cada dosis.

Todas las publicaciones mencionadas en el presente documento se incorporan por referencia para describir y desvelar metodologías y materiales que podrían usarse en relación con la presente invención. Nada contenido en el presente documento debe considerarse una admisión de que la invención no tenga derecho a preceder a dicha descripción en virtud de invención previa.

Habiendo descrito realizaciones preferidas de la invención haciendo referencia a los dibujos adjuntos, debe entenderse que la invención no se limita a estas realizaciones precisas y que pueden realizarse diversos cambios y modificaciones por un experto en la materia sin apartarse del alcance o espíritu de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.

Los siguientes ejemplos ilustran, pero no limitan la invención.

30 Materiales y Métodos

EJEMPLO 1

Ensayo en Placa de Varicela

Los títulos de infectividad de preparaciones de virus varicela zoster (VVZ) se midieron usando el procedimiento de recubrimiento de líquido descrito por Krah *et al.* (*J. Virol Methods* (1990) 27: 319-326). Este ensayo se realizó como se indica a continuación: se sembraron células MRC-5 (fibroblastos diploides de pulmón humano) en placas de cultivo de tejido de 60 mm a 600.000 células en volúmenes de 5 ml de BME (medio basal

de Eagle con solución salina equilibrada de Hank) con galactosa a 100 mg/l, neomicina a 50 ug/ml, L-glutamina 2 mM, y se incubaron a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ en una atmósfera humidificada con CO_2 al $5\% \pm 1\%$. Después de incubar durante 24-56 horas, las células alcanzaron una confluencia del 50-80% y se usaron para el ensayo en placas. El medio de crecimiento celular se retiró por aspiración y las células se infectaron con alícuotas de 100 μl de solución de VVZ diluida en un diluyente apropiado, tal como estabilizante PGS (PBS con sacarosa y gelatina hidrolizada).

Se dejó que el virus se uniera durante ≥ 1 hora a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ en una atmósfera humidificada con un $5\% \pm 1\%$ de CO_2 . Después, los cultivos se recubrieron con volúmenes de 5 ml de medio de mantenimiento (medio esencial mínimo con sales de Earle (MEM), suero bovino fetal inactivado térmicamente al 2%, neomicina a 50 $\mu\text{g/ml}$ y L-glutamina 2 mM) y se devolvieron a la incubación a $35 \pm 1^\circ\text{C}$ en una atmósfera humidificada con un $5\% \pm 1\%$ de CO_2 durante 6-7 días para el desarrollo de las placas. Después se aspiró el medio de las placas y las placas se visualizaron por tinción de las células con una solución de azul de Coomassie al 0,2% (p/v) R-250 en etanol, ácido acético al 1%. Los recuentos de placas fueron la media de 3-5 placas replicadas, y se multiplicaron por el factor de dilución (la inversa de la dilución correspondiente de virus ensayado) y el factor de corrección del volumen del inóculo (10, para ajustar de 0,1 ml a 1 ml) para proporcionar unidades formadoras de placas/ml (UFP/ml).

Dada la necesidad crítica de asegurar la ausencia de resultados de UFP falsos positivos para muestras inactivadas (en las que puede aparecer una mancha similar a una placa en la monocapa de células usada para el ensayo en placas debido al rasgado involuntario de la monocapa o debido a la presencia de un grupo de células), se creó un método de inmunotinción y se aplicó para verificar que los focos que se habían contado como placas efectivamente eran focos de células infectadas por VVZ (placas de VVZ). En resumen, después de la tinción con azul de Coomassie en el ensayo en placas convencional, los cultivos con placas visibles se incubaron con un suero policlonal anti-VVZ diluido en PBS, Tween 20 al 0,05 % e incubado durante 1 hora a 35°C . Las células se lavaron con PBS, Tween 20 al 0,05 % para retirar el anticuerpo no unido y se detectó el anticuerpo unido usando un anticuerpo IgG de cabra anti-humano conjugado con peroxidasa y un sustrato de peroxidasa (solución de diaminobencidina) que crea un precipitado cuando reacciona con peroxidasa. Se creó un precipitado de color marrón alrededor de los focos que contenían el VVZ, y no se detectaron placas adicionales aparte de las observadas usando la tinción con azul de Coomassie. Por lo tanto, este método de inmunotinción, usando una combinación de suero primario anti-VVZ, anticuerpo anti-especie primaria conjugado con peroxidasa y sustrato de peroxidasa, proporciona un método para verificar si una placa sospechosa en una muestra inactivada efectivamente representa VVZ infeccioso residual.

EJEMPLO 2

Ensayos ELISA de Antígeno de VVZ Competitivo y Elisa de Antígeno de VVZ de Unión Directa

Se usaron dos formatos de ensayo de antígeno para caracterizar y cuantificar el antígeno VVZ. En estudios exclusivos se usó un ELISA de antígeno competitivo, que imita el ensayo usado para estimar el antígeno de VVZ en el producto comercial de VVZ y utiliza un solo suero policlonal para detectar el antígeno de VVZ. Para proporcionar una caracterización adicional de la reactividad del antígeno de VVZ después de la irradiación gamma u otros tratamientos de inactivación, se creó y se aplicó un ELISA de unión directa, en el que la muestra de ensayo se adsorbió directamente en placas ELISA de microtitulación y después se detectó usando anticuerpos monoclonales o policlonales.

ELISA Competitivo para Cuantificación del Antígeno de VVZ

En resumen, este ensayo se realizó por incubación del antígeno de VVZ procedente de muestras de ensayo con una cantidad fija de suero policlonal anti-VVZ en solución. Se dejó que el anticuerpo libre que quedaba (no unido a antígeno) se uniera a un antígeno de VVZ convencional inmovilizado en placas de microtitulación ELISA. La cantidad de anticuerpo capaz de unirse a las placas es inversamente proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra de ensayo. La unión del anticuerpo a las placas se cuantificó por reacción con un anticuerpo anti-humano unido a enzima y un sustrato apropiado para proporcionar un producto coloreado que se cuantificó espectrofotométricamente.

El procedimiento de ensayo comprendía las siguientes etapas: (1) Se recubrieron placas ELISA con glicoproteínas (gp) de células MRC-5 infectadas con VVZ o no infectadas y se puso por encima albúmina de suero bovino al 1% (p/v) para reducir la adsorción de anticuerpo no específico en las placas. (2) Se diluyeron antígenos de VVZ de ensayo en estabilizante PGS en microtubos de polipropileno. Como control se incluyó una preparación de antígeno de VVZ de título de antígeno conocido. Las muestras típicamente se diluyeron a través de diluciones seriadas 1:1,25 veces para incluir concentraciones de antígeno que variaban de 2,6 a 0,9 unidades de antígeno/ml. Se usó la serie de dilución del patrón de VVZ para generar una curva patrón para la medición de antígeno en las muestras de ensayo. (3) Se diluyó un suero humano anti-VVZ en estabilizante PGS a dos veces la dilución final deseada. (4) Se distribuyeron volúmenes de trescientos µl de antígeno diluido en microtubos de polipropileno, se mezclaron con 300 µl de suero anti-VVZ diluido y se incubaron a 35-37°C durante 15-30 min. Como control se usó el suero anti-VVZ más diluyente (sin antígeno). (5) Se añadieron alícuotas de 100 µl de cada mezcla de suero-antígeno (y control) a 2 pocillos recubiertos con gp de VVZ replicados y 2 pocillos recubiertos con gp de MRC-5. (6) Las placas se incubaron durante 15-30 min. a 35-37°C para permitir que el anticuerpo libre (no complejo para ensayar el antígeno en solución)

se uniera al antígeno gp inmovilizado en las placas. (7) El anticuerpo no unido se retiró por lavado y los pocillos recibieron una solución de anticuerpo IgG de cabra anti-humano conjugado con fosfatasa para detectar el anticuerpo humano unido. (8) Después de la incubación durante 15-30 min a 35-37°C, se retiró el conjugado no unido por lavado. El conjugado unido se detectó por incubación durante 10-15 min a 35-37°C con sustrato de fosfato de p-nitrofenilo. (9) Después de terminar la reacción de sustrato por adición de 50 µl de NaOH 3M, se cuantificó el desarrollo de color (DO a 405 nm) usando un espectrofotómetro de microplacas.

El cálculo y la interpretación del ensayo comprendían las siguientes etapas:

- (1) Se promediaron los valores de DO replicados respectivos para los pocillos recubiertos con gp de MRC-5 y VVZ replicados. Se sabe por la experiencia que la DO de MRC-5 es constante entre diferentes muestras y diluciones. Por lo tanto, típicamente se promediaron los valores de DO de gp de MRC-5 para la serie entera ensayada y se usaron para corregir la unión no específica del anticuerpo primario (el suero anti-VVZ). La DO de gp de MRV-5 promediada se restó de las DO de gp de VVZ promediadas respectivas para proporcionar los valores específicos de VVZ (ΔDO). (2) Generación de una curva patrón para la medición de cantidades de antígeno: Se representaron los valores de ΔDO de la curva patrón frente a las concentraciones de antígeno conocidas (unidades de antígeno de VVZ/ml). Los datos se introdujeron en un programa gráfico apropiado, se identificó la parte lineal de la curva y se obtuvo la “fórmula de ajuste de línea” ($y=a+bx$) para esta curva lineal. (3) Cálculo de cantidades de antígeno de muestras de ensayo: Como los valores para a y b se proporcionan por la fórmula de ajuste de línea, e y (ΔDO) se conoce, el valor desconocido, x, que representa las unidades/ml de antígeno podría calcularse y corregirse por la dilución de la muestra para obtener la concentración de antígeno de la muestra de ensayo original (no diluida). La concentración de antígeno presentada es la obtenida con la muestra menos diluida que proporciona un valor de ΔDO dentro de la parte lineal de la curva patrón.

ELISA de Antígeno de VVZ de Unión Directa

- En resumen, este ensayo se realizó por incubación de diluciones de antígeno de VVZ de muestras de ensayo en placas de microtitulación de 96 pocillos para inmovilizar el antígeno, seguido de detección del antígeno unido con anticuerpos anti-VVZ monoclonales o policlonales. Los anticuerpos anti-VVZ unidos se cuantificaron por reacción con un anticuerpo anti-especie apropiada unido a enzima y un sustrato apropiado para proporcionar un producto coloreado que se cuantificó espectrofotométricamente. Después se compararon las curvas de titulación de DO frente a la dilución para las muestras (cuantificado como la diferencia de dilución en veces entre las curvas de titulación (“desplazamiento de curva”).

El procedimiento de ensayo comprendía las siguientes etapas: (1) Se recubrieron placas ELISA de lata unión con 200 µl de antígeno (vacuna) diluido en PBS

- 1:20 a 1:2560 en diluciones seriadas de dos veces. Las palcas se cubrieron y se almacenaron a 2-8°C durante una noche. (2) Se vertió el líquido de la etapa N° 1 y las palcas se aclararon tres veces con PBS + Tween 20 al 0,05%. Se retiró el aclarado final y se añadió anticuerpo diluido (100 µl/pocillo). Las placas se incubaron durante 1 hora a 35°C. (3) Se vertió el
- 5 líquido de la etapa N° 2 y las placas se aclararon tres veces con PBS + Tween 20 al 0,05%. Se retiró el aclarado final y se añadió conjugado diluido (100 µl/pocillo). Las placas se incubaron durante 1 hora a 35°C. (4) Se vertió el líquido de la etapa N° 3 y después las placas se aclararon tres veces con PBS + Tween 20 al 0,05%. Se retiró el aclarado final y se añadió sustrato (no diluido). Después, las placas se incubaron durante 30 minutos a 35°C.
- 10 (5) La reacción se detuvo con NaOH. (6) Se determinó la densidad óptica (DO) leyendo la placa a 405 nm.

- Los anticuerpos usados para este experimento fueron los siguientes: suero EPP y anticuerpos monoclonales purificados contra gE (Biodesig,n número de catálogo mab8612), gB (Chemicon, número de catálogo C05102M, Millipore Corp., Billerica, MA) y
- 15 gH (Biodesign, número de catálogo C05104M y Virusys, número de catálogo VA033-100, Virusys Corp., Taneytown, MD). Los conjugados usados fueron IgG anti-humana (BioSource, número de catálogo AHI0305, Invitrogen Corp., Carlsbad, CA) o IgG de cabra anti-ratón (Pierce número de catálogo 31322, Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL). Como sustrato se usaron 100 ml de fosfatasa alcalina pNPP (Sigma, número de catálogo
- 20 p7988, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO).

EJEMPLO 3

Ensayo ELISPOT IFN γ de VVZ

- 25 En resumen, se incubaron diluciones seriadas de antígenos de ensayo, que variaban de 1 a 0,125 unidades de antígeno VVZ/ml, con PBMC de 6 donantes en pocillos por duplicado. Después de la incubación, se identificaron las células que respondían al antígeno de VVZ por su capacidad de producir interferón gamma. La producción de interferón gamma se detectó usando anticuerpo de ratón anti-interferón gamma aplicado
- 30 como un recubrimiento en una placa de microtitulación, y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón correspondiente conjugado con enzima y sustrato, que condujo a la detección del sustrato precipitado alrededor de las células productoras de interferón gamma (“manchas”). El número de células formadoras de manchas (CFM: las que forman manchas que indican secreción de interferón gamma) se cuantificó por un lector ELISPOT
- 35 automático, y los resultados se expresaron como CFM por 10⁶ PBMC.
- Resultados

EJEMPLO 4

Cinética de Inactivación de VVZ Sometido a Irradiación Gamma

Los presentes solicitantes previamente habían ensayado el tratamiento térmico como un método para inactivar VVZ liofilizado para uso como una vacuna para

5 pacientes inmunocomprometidos, pero descubrieron que este método daba como resultado una infectividad residual de la preparación viral (véase más adelante). Se consideró que esta infectividad residual no era una característica óptima de la vacuna “inactivada”. Se consiguió una inactivación más extensa de la vacuna líquida a granel con respecto a la vacuna liofilizada, pero se determinó que el tratamiento térmico de la vacuna a granel no

10 proporcionaba un proceso de fabricación óptimo. De esta manera, se investigó un método de inactivación alternativo para la vacuna de virus varicela zóster (Oka/Merck) liofilizada usando irradiación gamma ^{60}Co para ver si podía identificarse una inactivación más extensa de la infectividad (que produjera un perfil de seguridad más favorable) que la conseguida con el tratamiento térmico. Los objetivos de esta evaluación eran primero determinar si

15 podía conseguirse una activación más extensa de la infectividad por irradiación con ^{60}Co y después, en segundo lugar, si las propiedades de antígeno conseguidas después de la irradiación gamma diferían de las del material tratado térmicamente y eran aceptables para los estudios de aplicación clínica. Se irradiaron viales de VVZ usando ~1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 kGy (2007) o 0,45, 1,35 y 2,7 kGy. La irradiación se realizó usando un irradiador ^{60}Co

20 Gammacell® (Best Theratronics Ltd. Corporation, Ottawa, Ontario, Canadá).

El valor de UFP residuales/ml de cada vial por dosis de radiación (Gy) se determinó usando el ensayo en placas de varicela en células MRC-5. Se representó el log de UFP/ml frente a la dosis de radiación y los puntos de datos mostraron una regresión lineal de inactivación (FIGURA 1). Después del estudio cinético, los presentes solicitantes

25 ensayaron 100 ml de vacuna de VVZ inactivada irradiada con rayos ^{60}Co hasta 12 kGy (liofilizada inactivada) para permitir la confirmación ampliada del grado de inactivación (ensayando un mayor volumen total). Se detectaron cero placas en la muestra de 100 ml.

Además, se usaron rayos ^{60}Co para irradiar la masa a granel de VVZ. La masa a granel se descongeló y se dividió en alícuotas en frascos de PETG para la irradiación

30 a 0,5, 1, 2, 3, 4, 5 y 6 kGy (FIGURA 2). La masa a granel irradiada se analizó con respecto a la infectividad residual en un ensayo en placas de varicela usando células MRC-5. Se detectaron cero placas en muestras de 100 ml de masa a granel irradiada (6 kGy). Se observaron cinéticas de inactivación lineal representando el log de ufp/ml de título frente al tiempo de radiación.

35

EJEMPLO 5

Evaluación de Inmunogenicidad por el Ensayo ELISPOT IFN γ de VVZ

Para evaluar el impacto de diferentes métodos de inactivación sobre la inmunogenicidad, se realizó un ensayo ELISPOT IFN γ de VVZ como se describe en el

5 Ejemplo 3 usando 6 muestras de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes. Este estudio se realizó para determinar si la respuesta de IFN γ disminuye después de inactivar al VVZ en diferentes condiciones. Se ensayaron 5 preparaciones en masa a granel de VVZ tratado térmicamente, junto con dos preparaciones de masa a granel de VVZ sometido a irradiación gamma. Las preparaciones de VVZ tratado térmicamente consistían

10 en muestras que se trataron en las siguientes condiciones: (1) 40°C durante 24 horas, (2) 45°C durante 3,5 horas, (3) 45°C durante 4,5 horas, (4) 56°C durante 30 minutos y (5) 90°C durante 90 minutos. Las muestras sometidas a irradiación gamma consistían en masas a granel de VVZ sometidas a irradiación gamma durante 3 o 4 horas a 5,92 kGy. También se ensayaron con fines comparativos muestras de VVZ vivas (no tratadas) de las mismas

15 preparaciones de masa a granel que las usadas anteriormente para crear muestras inactivadas.

También se incluyó como antígeno del ELISPOT un lote de VVZ que se había inactivado por tratamiento con luz UV (lote de VVZ N° 96.07), como control de ejecución del ensayo junto con PHA (control positivo) y medio (control negativo). Todos

20 los antígenos se evaluaron mediante una dilución seriada de dos veces de 1:40 a 1: 320. Se realizó un ensayo que ensayaba 6 muestras de PBMC, elegidas para representar un intervalo de valores de respuesta de VVZ.

Los recuentos de manchas de VVZ resultantes (CFM/10⁶ PBMC) se muestran en las Figuras 3A-F. No hubo pruebas que sugirieran una diferencia en la

25 respuesta de VVZ para las preparaciones de antígeno inactivadas en comparación con la preparación de antígeno no tratado entre los donantes ensayados. Tampoco hubo pruebas de una interacción significativa entre la preparación (tratamiento) y la respuesta a niveles de dilución particulares. Con respecto a la preparación de VVZ vivo, las diferencias en veces del recuento del ELISPOT para las 8 preparaciones de VVZ inactivadas, incluyendo el Lote

30 de VVZ N° 96.07 original, variaban de 1,15 veces menor (56°C durante 90 minutos) a 1,14 veces mayor (40°C durante 24 horas; Lote N° 96.07) con respecto a la preparación de VVZ vivo. Con respecto a la preparación de VVZ vivo, ninguna de las 8 preparaciones de VVZ inactivado produjo recuentos ELISPOT significativamente menores desde el punto de vista estadístico entre los donantes ensayados.

35 De esta manera, el ensayo ELISPOT humano no mostró ninguna diferencia significativa en respuestas usando PBMC de un panel de donantes, para preparaciones de VVZ inactivadas por diferentes procedimientos (tratamiento térmico a 40°C, 45°C o 56°C o irradiación gamma de la masa a granel).

EJEMPLO 6

Análisis de Microscopía Electrónica de Vacuna de VVZ Inactivada

- Se realizaron análisis de ME de masas a granel sometidas a irradiación gamma y tratadas térmicamente y vacuna liofilizada para proporcionar una caracterización adicional de los efectos de la inactivación sobre las preparaciones de VVZ inactivados. El método de análisis seleccionado fue microscopía electrónica de crío-transmisión (crio-MET) en hielo vítreo para conservar mejor la integridad del virus durante el análisis de ME. La Crio-MET se realizó por NanoImaging Services, Inc (San Diego, CA).
- Se prepararon muestras de VVZ inactivado para el análisis de ME para evaluar los efectos de la inactivación sobre la integridad/aspecto de las partículas. Se rehidrataron muestras liofilizadas con 700 µl de agua destilada estéril y no se diluyeron adicionalmente antes de la obtención de las imágenes. Las muestras se conservaron en una película fina de hielo vítreo soportado en una película de carbono agujereada C-Flat de 2,0x0,5 um (Protochips, Inc., Raleigh, NC) sobre rejillas de cobre de malla 400. Las rejillas se limpiaron inmediatamente antes del uso en un limpiador de plasma Solarus (10 segundos, 25% de CO₂, 75% de Ar). Todas las muestras se prepararon aplicando una gota (~ 3 µl) de la suspensión de muestra a la rejilla limpiada con plasma, secando con papel de filtro y procesando inmediatamente con vitrificación en etano líquido, usando un FEI Vitrobot™ (4C, 95% de RH). Las rejillas se almacenaron en nitrógeno líquido hasta que se transfirieron al microscopio electrónico para la obtención de imágenes. La microscopía electrónica se realizó usando un microscopio electrónico FEI Tecnai™ T12 (FEI Company, Hillsboro, OR), que funcionaba a 120 KeV, equipado con una cámara FEI Eagle™ 4K x 4K CC (FEI Company). Se adquirieron imágenes de cada rejilla a múltiples escalas para evaluar la distribución global de la muestra. Después de identificar áreas diana para la obtención de imágenes a menos aumentos, se adquirieron pares de imágenes de más aumentos.
- Las muestras se evaluaron usando un instrumento NanoImaging Systems (amplificación 21K-52K). Se compararon VVZ liofilizado no tratado, VVZ liofilizado tratado térmicamente durante 77 días a 56°C y VVZ liofilizado irradiado a 25 o 50 KGy usando una fuente de ⁶⁰Co.
- Los resultados de la Crio ME indican efectos potenciales en las partículas a altas dosis de irradiación gamma, con una reducción en la densidad electrónica (que quizás refleje la degradación del ADN viral), pero sin efecto significativo sobre las partículas en general y el aspecto de las proteínas en el caso de las muestras liofilizadas. Sin embargo, la liofilización puede proteger de estos cambios ya que las muestras inactivadas liofilizadas mostraron una pérdida de densidad electrónica, pero las partículas permanecieron intactas a altas dosis. (Véase la Figura 4).

EJEMPLO 7

Determinación de reactividad de antígeno

Se realizaron ensayos ELISA de Ag de VVZ para determinar el contenido de antígeno (Ag) de muestras de masa a granel inactivada térmicamente o por irradiación gamma o VVZ liofilizado sometido a irradiación gamma, usando un suero policlonal humano y anticuerpos monoclonales (mAb) contra gB, gH y gE de VVZ como anticuerpos de detección. La masa a granel sometida a irradiación gamma o las muestras liofilizadas no mostraron cambios en la reactividad del antígeno. Sin embargo, las muestras tratadas térmicamente a 56°C durante 90 minutos mostraron un cambio en la reactividad de antígeno con los anticuerpos monoclonales gE y gH y los anticuerpos policlonales.

Se sometieron muestras adicionales en masa a granel de VVZ a irradiación gamma a 25 kGy y 50 kGy para confirmar el uso de 50 kGy como una exposición superior para la esterilización terminal. Estas muestras se ensayaron en un ensayo ELISA de antígeno de unión directa en suero policlonal anti-VVZ y mAb contra gpE, gB y gH.

La irradiación gamma de la vacuna de VVZ liofilizado en condiciones de esterilización (25-50 kGy) no afectaba de forma detectable a la reactividad del ELISA del antígeno con suero policlonal o anticuerpos monoclonales gE o gB. Los resultados obtenidos usando el mAb de gH no fueron concluyentes debido a la alta tinción de fondo. También se observó una mayor señal de fondo con este anticuerpo monoclonal (y no con los de gE o gB) usando una placa ELISA alternativa (Maxisorp).

EJEMPLO 8

Inmunogenicidad en ratón

Se realizó un estudio de inmunogenicidad en ratón para evaluar una serie de preparaciones de VVZ inactivado (VVZi) generadas usando diversos métodos para la inactivación. Se evaluaron muestras de suero generadas a partir del estudio en el ensayo ELISA de VVZ para determinar el título relativo de anticuerpos contra VVZ generado por las diferentes formulaciones de VVZ inactivado. Se generaron y evaluaron dos preparaciones de masa a granel de VVZ diferentes: (1) masa a granel de VVZ, tratada térmicamente a 56°C durante 90 minutos, y (2) masa a granel de VVZ, sometida a irradiación gamma con 5.924,7 Grays (Gy) durante 3 horas. También se generaron dos preparaciones de vacuna liofilizada de VVZ diferentes y se evaluaron: (1) vacuna de VVZ liofilizada, tratada térmicamente a 56°C durante 50 días, y (2) vacuna de VVZ liofilizada, sometida a irradiación gamma con 25.000 Gy. Se evaluaron la masa a granel de VVZ vivo (no tratado) y la vacuna liofilizada de VVZ vivo (no tratado) para la comparación con las preparaciones de masa a granel de iVVZ.

Se inmunizaron ratones BALB/c (n = 16 para cada grupo) por vía intraperitoneal (i.p.) con 4,5 unidades de antígeno de VVZ (U)/ratón (9 U/ml) los días 0, 14

y 29. Se recogieron muestras de sangre (suero) el día -1 (antes de la extracción de sangre) y los días 13, 28 y 43. El día 28 (14 días después de la dosis 2) se evaluaron los sueros en el ELISA de VVZ con respecto a la respuesta de IgG.

Los títulos de VVZ ajustados (título de VVZ menos título de MRC-5) se muestran en la Figura 5. Los sueros antes de la extracción de sangre se ensayaron con el grupo correspondiente desde el día 28 para determinar un límite de título para MRC-5 y VVZ. Se recubrieron pocillos de placas ELISA con extracto de MRC-5 o VVZ tratado UV y después se incubaron con dilución del suero de ratón de ensayo para cuantificar las cantidades relativas de anticuerpos específicos para VVZ en los sueros de ratón.

Los resultados indican que el título de IgG de la masa a granel tratada térmicamente era, en promedio, 5,57 veces menor (IC 95% = (3,45, 8,99)) y el título de IgG de la masa a granel sometida a irradiación gamma era, en promedio, 2,43 veces menor (IC 95% = (1,51, 3,93)) con respecto a la masa no tratada. El título del liofilizado tratado térmicamente era, en promedio, 1,38 veces menor (IC 95% = (1,00, 1,90)) y el título del liofilizado sometido a irradiación gamma era, en promedio, 1,66 veces menor (IC 95% = (1,22, 2,26)) que el virus liofilizado no tratado. El título de anticuerpo con la masa a granel sometida a irradiación gamma fue 2,29 veces mayor (IC 95% = (1,54, 3,41)), en promedio, que el título obtenido después de la inmunización con la masa a granel tratada térmicamente. El título de anticuerpo con el virus liofilizado sometido a irradiación gamma fue 1,20 veces menor (IC 95% = (0,89, 1,61)), en promedio, que el título obtenido después de la inmunización con la preparación liofilizada tratada térmicamente. Los datos totales confirman que la irradiación gamma del virus liofilizado tiene un mínimo impacto sobre la inmunogenicidad en este modelo.

Los resultados muestran que las respuestas de anticuerpos (IgG) se habían reducido en ratones después de la inmunización con dos dosis de las preparaciones inactivadas en comparación con las masas a granel no tratadas.

EJEMPLO 9

Administración de vacuna de VVZ inactivado a pacientes sanos con edades de 50-59

Se administró una vacuna de VVZ sometido a irradiación gamma a adultos sanos de 50 a 59 años de edad en un estudio multicéntrico, de dos partes, doble ciego, aleatorio, que estaba diseñado para evaluar la seguridad, tolerancia e inmunogenicidad de la vacuna. El objetivo de este estudio era estudiar la seguridad, tolerancia e inmunogenicidad de lotes de vacuna inactivados por métodos de irradiación gamma o tratamiento térmico.

Un total de 161 individuos sanos de 50 a 59 años de edad se distribuyeron aleatoriamente 2:2:1 para recibir vacuna de VVZ sometido a irradiación gamma "A", inactivado a 16-25 kGy (n=65), vacuna de VVZ tratado térmicamente (n= 63) o placebo (n=33) administradas como un régimen de 4 dosis. Cada dosis se administró con un

intervalo de aproximadamente 30 días. La vacuna tratada térmicamente y la vacuna sometida a irradiación gamma “A” se obtuvieron a partir de lotes de masa a granel independientes pero se controlaron mediante la dirección a un contenido de antígeno similar.

- 5 La hipótesis primaria era que la vacuna de VVZ sometido a irradiación gamma (A) inactivada a un nivel de 16 a 25 kGy induciría una respuesta inmune específica de VVZ aceptable medida por gpELISA 28 días después de la dosis 4. La hipótesis secundaria era que la vacuna de VVZ tratada térmicamente induciría una respuesta inmune específica de VVZ aceptable medida por gpELISA 28 días después de la dosis 4. El criterio estadístico para el éxito corresponde al límite inferior del intervalo de confianza del 95% bilateral sobre la variación de la media geométrica (GMFR) de los receptores de la vacuna de VVZ tratado térmicamente que era $> 1,0$. Los resultados de inmunogenicidad entre los receptores de la vacuna en este estudio se proporcionan en la Figura 6.

- 10 Los resultados indican que los criterios de éxito para el ensayo de la hipótesis primaria y secundaria se cumplieron, es decir, la vacuna de VVZ sometido a irradiación gamma A y la vacuna de VVZ tratado térmicamente eran inmunogénicas cuando se administraban a individuos sanos. Los dos grupos de vacuna tenían perfiles de seguridad similares a los del grupo de placebo.

20 EJEMPLO 10

Administración de lotes de vacuna de VVZ inactivado con diferentes niveles de irradiación gamma a voluntarios sanos con edades de 50 a 59 años.

- Se realizó un segundo estudio para proporcionar datos clínicos sobre lotes de vacuna inactivados con un mayor intervalo de irradiación gamma. En este estudio, un total de 129 individuos sanos de 50 a 59 años de edad se distribuyeron aleatoriamente 1:1 a recibir vacuna de VVZ sometido a irradiación gamma “B”, irradiado a 16-25 kGy (n=64) o vacuna de VVZ sometido a irradiación gamma “C”, irradiado a 25-50 kGy (n=65) administrada como un régimen de 4 dosis, administrándose cada dosis con un intervalo de aproximadamente 30 días. Los lotes de vacuna B y C utilizados en este estudio procedían del mismo lote de masa a granel y el mismo relleno/formulación con un contenido de antígeno de VVZ idéntico, pero se inactivaron a diferentes niveles de irradiación gamma.

- La primera hipótesis primaria de este estudio era que la vacuna de VVZ sometido a irradiación gamma (C) inactivado a un nivel de 25 a 50 kGy induciría una respuesta inmune específica de VVZ aceptable medida por gpELISA a los 28 días después de la dosis 4. La segunda hipótesis primaria era que la vacuna de VVZ sometido a irradiación gamma (B) inactivado a un nivel de 16 a 25 kGy y correspondiente para el contenido de antígeno con la vacuna inactivada a 25-50 kGy induciría una respuesta inmune específica de VVZ aceptable medida por gpELISA a los 28 días después de la dosis 4. El

criterio estadístico de éxito para cada hipótesis corresponde al límite inferior del intervalo de confianza del 95% bilateral sobre la GMFR de los receptores de la vacuna sometida a irradiación gamma que era $> 1,0$. Los resultados de inmunogenicidad entre los receptores de la vacuna en este estudio se proporcionan en la Figura 7.

5 Los resultados de este estudio indican que se cumplían los criterios de éxito para ensayar la hipótesis primaria, es decir, la vacuna de VVZ sometido a irradiación gamma (B) (sometido a una radiación gamma de 16-25 kGy) y la vacuna de VVZ sometida a irradiación gamma (sometida a una radiación gama de 25-50 kGy) eran inmunogénicas cuando se administraban a individuos sanos. Los dos grupos de vacuna tuvieron perfiles de
10 seguridad similares.

 Los resultados de este estudio también indican que había un desequilibrio de la media geométrica del título (GMT) basal; el valor de GMT basal del grupo B era de ~313, el valor de GMT basal del grupo C era de ~429. El aumento en veces de diferencias no era significativo, la diferencia en los títulos basales puede explicar el aumento en veces
15 de diferencias observadas en el ensayo. Además, los datos analíticos indican que la mayor dosis de irradiación gamma (>25 kGy) da como resultado una mayor degradación de antígeno.

REIVINDICACIONES

1. Un virus varicela zóster (VVZ) inactivado, donde la infectividad del VVZ es indetectable y donde el VVZ induce una respuesta inmune contra VVZ cuando se administra a un paciente.
2. Una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del VVZ de la reivindicación 1 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
3. La composición farmacéutica de la reivindicación 2, en la que la infectividad del VVZ es $\leq 0,040$ unidades formadoras de placas (UFP)/ml.
4. La composición farmacéutica de la reivindicación 3, en la que la infectividad del VVZ es $\leq 0,010$ unidades formadoras de placas (UFP)/ml.
5. La composición farmacéutica de la reivindicación 4, en la que la infectividad del VVZ es $\leq 0,002$ unidades formadoras de placas (UFP)/ml.
6. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en la que la cepa VVZ es una cepa Oka o un derivado de la cepa Oka.
7. La composición farmacéutica de la reivindicación 6, donde la composición está liofilizada.
8. La composición farmacéutica de la reivindicación 7, en la que el VVZ está inactivado por irradiación gamma.
9. La composición farmacéutica de la reivindicación 8, en la que la respuesta inmune inducida por la composición no es significativamente diferente de la respuesta inmune inducida por una muestra de control que comprende la misma cantidad del VVZ que no se ha inactivado.
10. La composición farmacéutica de la reivindicación 9, en la que la respuesta inmune inducida por el VVZ inactivado difiere de la respuesta inmune inducida por la muestra de control en un 25% o menos.

11. La composición farmacéutica de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en la que la infectividad del VVZ se determina por un ensayo en placas de varicela.
12. Un método para preparar un virus varicela zóster (VVZ) inactivado que comprende someter a irradiación gamma una muestra que comprende un VVZ usando de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 kGy de radiación gama.
13. El método de la reivindicación 12, en el que la radiación gamma se proporciona a la muestra exponiendo la muestra a rayos ^{60}Co .
14. El método de la reivindicación 13, en el que el VVZ es la cepa Oka o un derivado de la cepa Oka.
15. El método de la reivindicación 13, en el que la muestra se liofiliza antes de irradiarse.
16. El método de la reivindicación 14 o la reivindicación 15, en el que la cantidad de radiación gama usada es de aproximadamente 25 kGy o menor.
17. El método de la reivindicación 16, en el que la vacuna es una formulación de masa líquida a granel y la cantidad de radiación gama usada es de aproximadamente 5 kGy a aproximadamente 12,5 kGy.
18. El método de la reivindicación 15, en el que la cantidad de radiación gamma usada es de aproximadamente 10 kGy a aproximadamente 25 kGy.
19. Un VVZ inactivado producido o que puede obtenerse por el método de cualquiera de las reivindicaciones 12-18.
20. Una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz del VVZ inactivado de la reivindicación 19 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
21. Un método para el tratamiento de herpes zóster en un sujeto, comprendiendo el método administrar al sujeto una composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un virus varicela zóster (VVZ) inactivado y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el VVZ se inactiva con irradiación gamma.

22. El método de la reivindicación 21, en el que la vía de administración de la composición farmacéutica es subcutánea o intramuscular.

23. El método de la reivindicación 22, en el que el sujeto tiene 50 años o
5 más.

24. El método de la reivindicación 22 ó 23, en el que el sujeto está inmunocomprometido.

10 25. El método de la reivindicación 24, en el que el sujeto tiene al menos una afección seleccionada del grupo que consiste en: padecimiento de una malignidad hematológica, sometimiento a una terapia inmunosupresora, haber recibido un trasplante de células madre hematopoyéticas, haber recibido un trasplante de órganos sólidos, infección con VIH y padecimiento de una enfermedad autoinmune.

15 26. El método de la reivindicación 22 ó 23, en el que el método comprende además permitir que transcurra un periodo de tiempo predeterminado, y administrar al sujeto una o más dosis de la composición farmacéutica.

RESUMEN DE LA DESCRIPCIÓN

La invención proporciona un virus varicela zóster (VVZ) inactivado, y composiciones y vacunas que comprenden dicho VVZ inactivado, donde la infectividad del VVZ es indetectable y donde el VVZ inactivado induce una respuesta inmune contra VVZ cuando se administra a un paciente. En realizaciones de las composiciones descritas en el presente documento, el VVZ se inactiva con radiación gamma. La invención también proporciona un método para preparar una vacuna de VVZ inactivado, comprendiendo el método someter a irradiación gamma una muestra que comprende VVZ usando de aproximadamente 5 kGy a aproximadamente 50 kGy de irradiación gama. También se proporciona por la invención del presente documento un método de tratamiento o de inmunización contra HZ u otra enfermedad asociada con la reactivación de VVZ, comprendiendo el método administrar a un sujeto una vacuna o composición farmacéutica que comprende una cantidad terapéuticamente eficaz de un VVZ inactivado y un vehículo farmacéuticamente aceptable, donde el VVZ se inactiva por irradiación gamma.

FIGURA 1

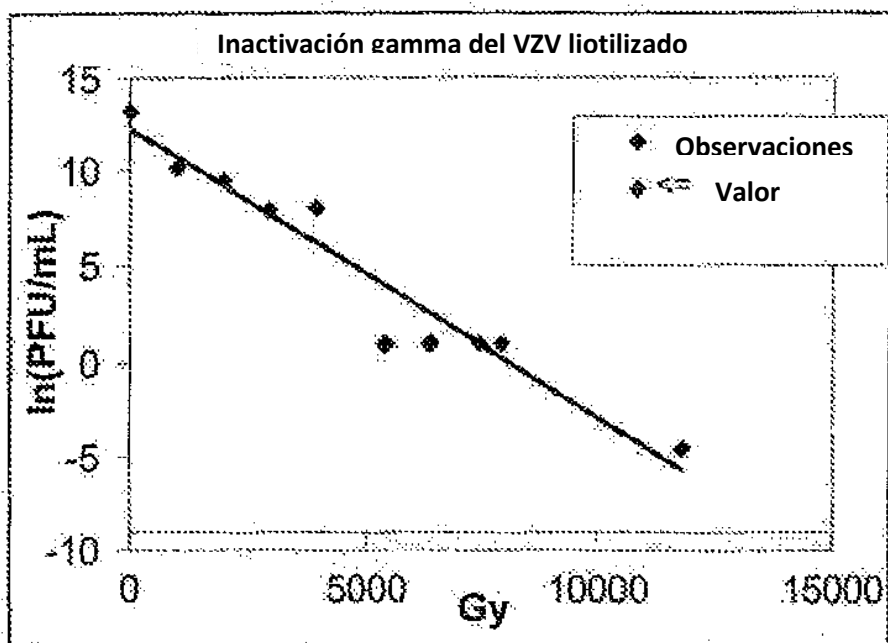


FIGURA 2

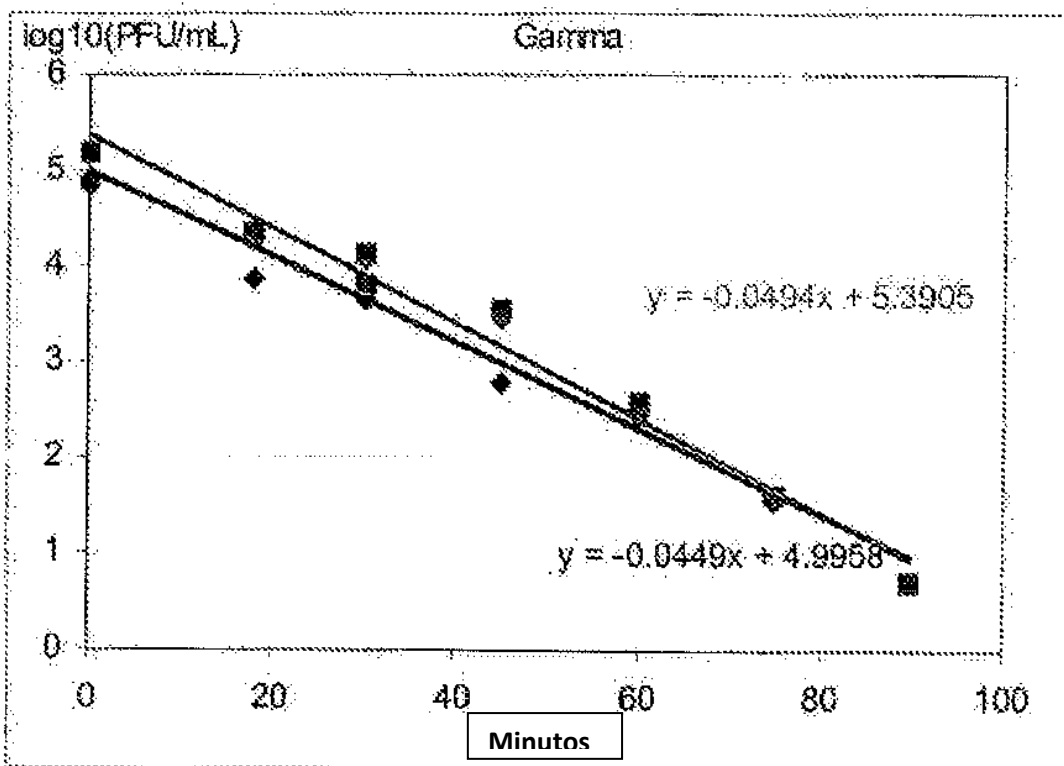


FIGURA 3 Respuesta VZV por donante y preparación

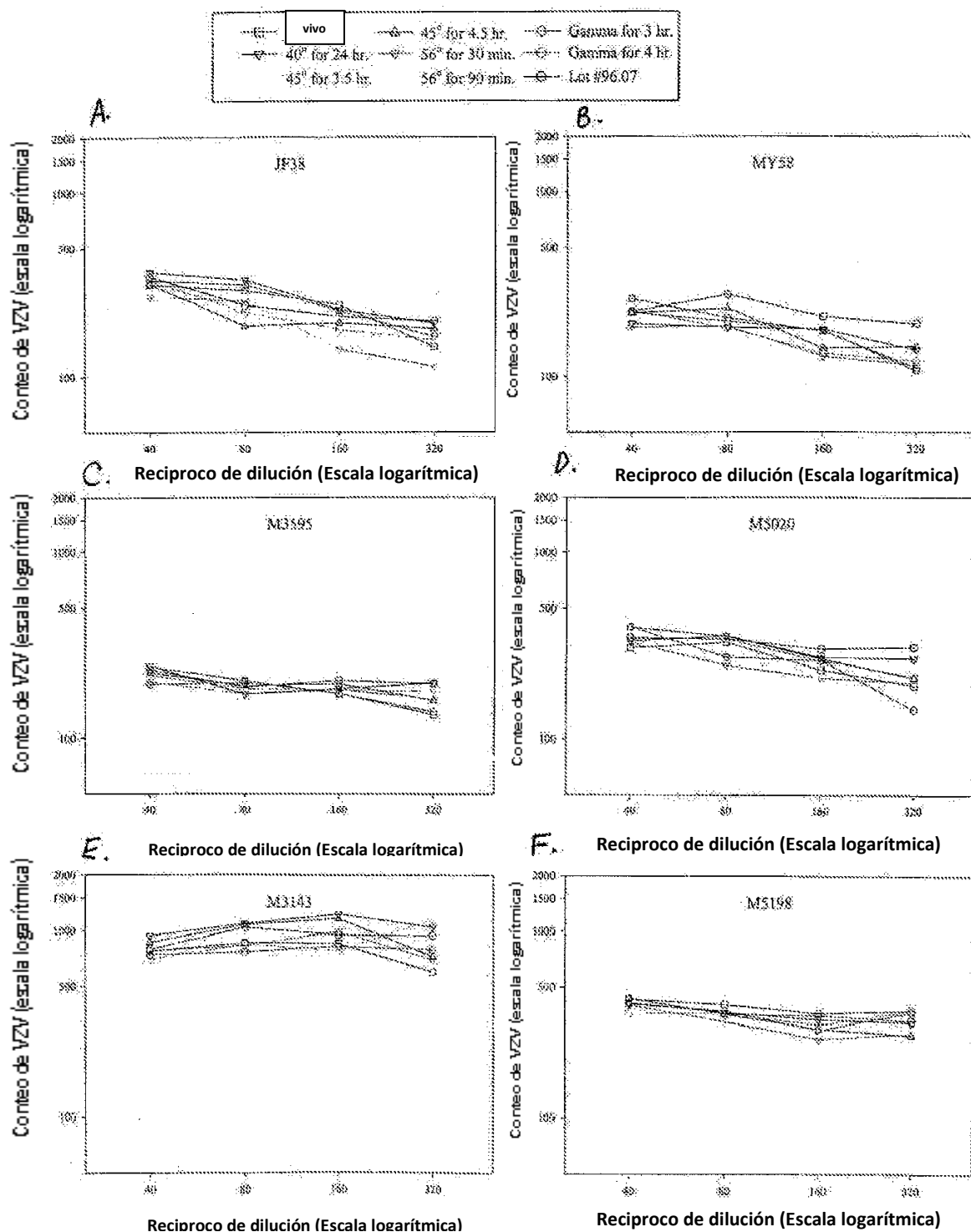


FIGURA 4

Análisis crio EM de VZV liofilizado

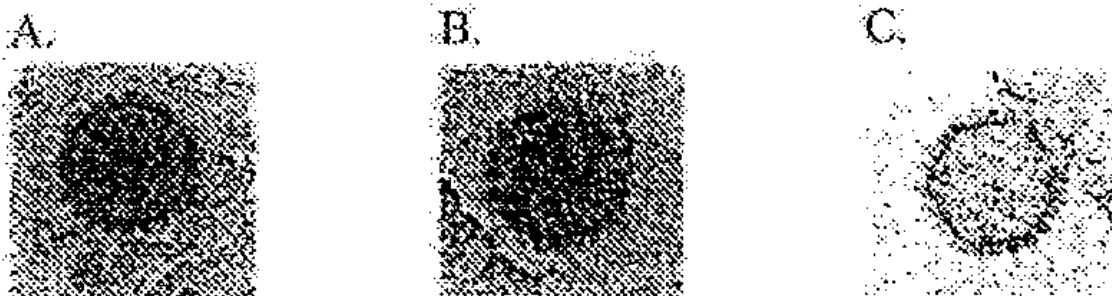


FIGURA 5 -Titulación VZV ajustado mediante preparación

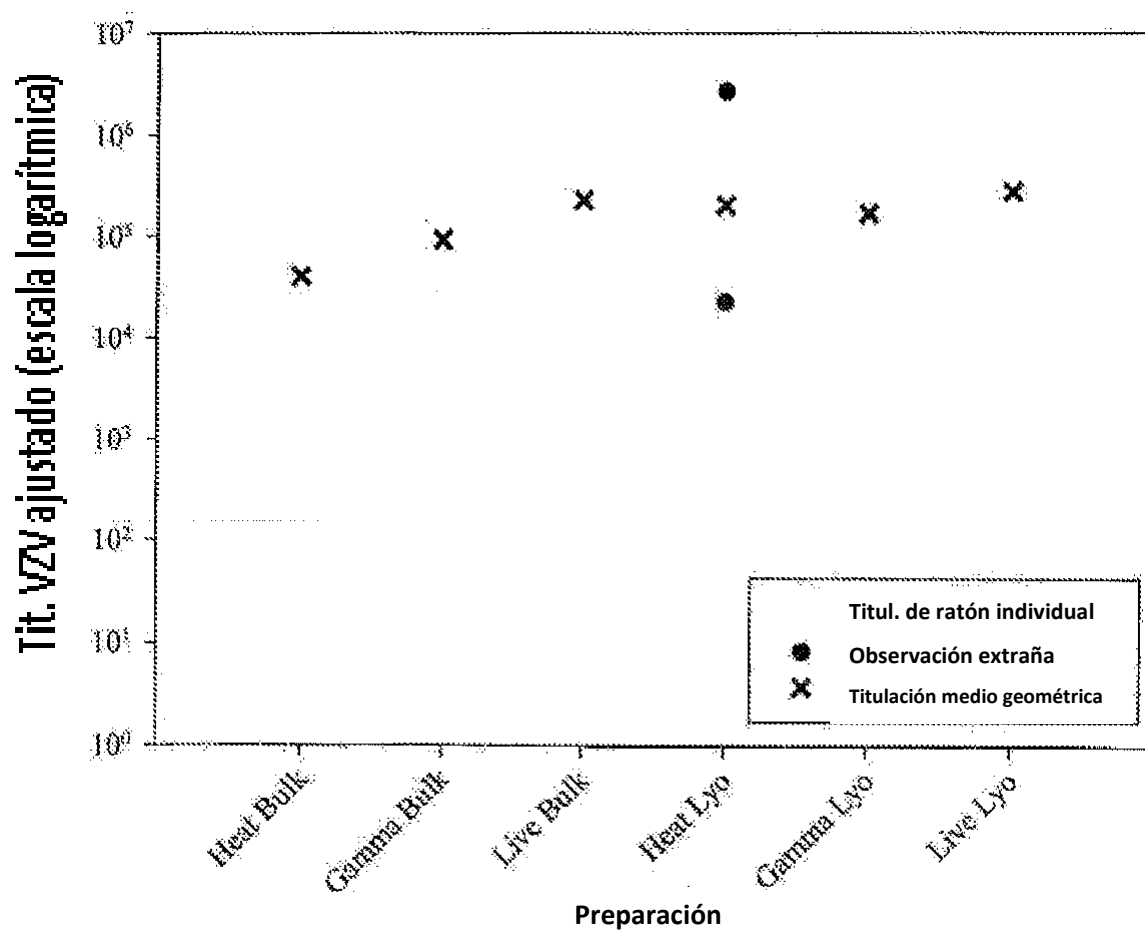


FIGURA 6

Análisis Estadístico de Respuestas a Anticuerpos de VZV gpELISA mediante intervalos de tiempo entre recipientes de vacunas (Población por protocolo)

Criterio de Valoración	Heat-Treated VZV Vaccine (N=65)			Valor P	Vacuna VZV A irradiada con rayos gama			
	n	Estimated Response ¹	(95% CI) ²		n	Resp. Estimada	(95% CI) ²	p-Value
21-35 días por dosis 1								
GMT	62	484.36	(372.10, 618.47)		59	524.74	(410.80, 670.30)	
Aumento en veces de la media geométrica a partir del Día. 1	62	1.67	(1.38, 2.03)		59	1.72	(1.48, 2.00)	
21-35 Days Post Dose 2								
GMT	62	560.77	(436.73, 720.04)		59	598.98	(474.93, 755.42)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	62	1.94	(1.61, 2.34)		59	1.96	(1.62, 2.37)	
21-35 Days Post Dose 3								
GMT	62	585.72	(474.47, 723.06)		59	689.98	(543.82, 875.43)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	62	2.02	(1.68, 2.43)		59	2.26	(1.89, 2.69)	
21-35 Days Post Dose 4								
GMT	62	608.67	(492.50, 752.25)		59	666.27	(532.81, 833.16)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	62	2.10	(1.78, 2.48)	<0.0001	59	2.18	(1.82, 2.61)	<0.0001

t= Calculado basado en modelo de regresión longitudinal (ajustado para nivel de inmunogenicidad pre-vacunación en presencia de datos incompletos), con visit como covariado. El modelo se introdujo en cada grupo de vacunación por separado.

N= numero de sujetos vacunados en cada grupo

n= numero de sujetos que contribuyeron en este análisis de inmunogenicidad (con resultados validos el inicio y en los intervalos de tiempo por inicio).

gpELISA= Ensayo inmunosorbente ligado con enzima glicoproteica

GMT=Titulación media geométrica i CL=intervalo de confianza; VZV= Virus de varicela -zóster

FIGURA 7

Análisis Estadístico de Respuestas a Anticuerpos de VZV gpELISA mediante intervalos de tiempo entre recipientes de vacunas (Población por protocolo)

Criterio de Valoración	Vacuna VZV B irradiada con rayos gamma				Vacuna VZV C irradiada con rayos gamma			
	(N=64)				(N=65)			
	n	Estimated Response ¹	(95% CI) ²	p-Value	n	Estimated Response ²	(95% CI) ³	p-Value
21-35 Days Post Dose 1								
GMT	59	599.04	(463.53, 770.84)		63	646.12	(507.55, 822.52)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	59	1.91	(1.58, 2.32)		63	1.50	(1.29, 1.75)	
21-35 Days Post Dose 2								
GMT	59	638.49	(505.07, 807.15)		63	712.55	(571.77, 888.00)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	59	2.04	(1.69, 2.46)		63	1.66	(1.44, 1.92)	
21-35 Days Post Dose 3								
GMT	59	566.13	(454.64, 704.98)		63	601.06	(483.71, 746.88)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	59	1.81	(1.48, 2.21)		63	1.40	(1.21, 1.62)	
21-35 Days Post Dose 4								
GMT	59	594.03	(479.90, 738.32)		63	676.64	(544.98, 840.10)	
Geometric Mean Fold Rises from Day 1	59	1.90	(1.57, 2.29)	<0.0001	63	1.58	(1.35, 1.84)	<0.0001

t= Calculado basado en modelo de regresión longitudinal (ajustado para nivel de inmunogenicidad pre-vacunación en presencia de datos incompletos), con visit como covariado. El modelo se introdujo en cada grupo de vacunación por separado.
N= numero de sujetos vacunados en cada grupo
n= numero de sujetos que contribuyen en este análisis de inmunogenicidad (con resultados validos el inicio y en los intervalos de tiempo por inicio).
gpELISA= Ensayo inmunosorbente ligado con enzima glicoproteica
GMT=Titulación media geométrica i CL=intervalo de confianza; VZV= Virus de varicela -zóster

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference MRLIFD00026	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 11/46534	International filing date (day/month/year) 04 August 2011 (04.08.2011)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 05 August 2010 (05.08.2010)
Applicant MERCK SHARP & DOHME CORP.		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 2 sheets.

☐ It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. Basis of the report

a. With regard to the language, the international search was carried out on the basis of:

- ☒ the international application in the language in which it was filed.
☐ a translation of the international application into _____ which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b)).

b. ☐ This international search report has been established taking into account the rectification of an obvious mistake authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43.6bis(a)).

c. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, see Box No. I.

2. ☐ Certain claims were found unsearchable (see Box No. II).

3. ☐ Unity of invention is lacking (see Box No. III).

4. With regard to the title,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established by this Authority to read as follows:

5. With regard to the abstract,

- ☒ the text is approved as submitted by the applicant.
☐ the text has been established, according to Rule 38.2, by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority.

6. With regard to the drawings,

- a. the figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. 1
☒ as suggested by the applicant.
☐ as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure.
☐ as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention.
- b. ☐ none of the figures is to be published with the abstract.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 11/46534

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - A61K 39/25; A61K 39/245; A61K 39/275; A61K 39/285; C12N 7/04 (2011.01)

USPC - 424/230.1

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC(8): A61K 39/25; A61K 39/245; A61K 39/275; A61K 39/285; C12N 7/04 (2011.01)

USPC: 424/230.1

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

IPC(8): C12N 7/04; A61K 39/275 (2011.01)

USPC: 435/236, 435/948, 424/232.1

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

PubWEST;PGPB, USPT, EPAB, JPAB, GoogleScholar, ScienceDirect, Dialog

Inactivated varicella zoster virus (VZV), plaque-forming units (PFU's), Oka strain or derivative, lyophilized, gamma irradiation, 60Co, control, varicella plaque assay, treatment of herpes zoster/shingles, subcutaneous or intramuscular, immunocompromised, booster etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X ----- Y	US 6,214,354 B1 (CALANDRA et al.) 10 April 2001 (10.04.2001) col 3, ln 15-31, ln 50-60, col 4, ln 15-20, col 4, ln 25-35, col 8, ln 40-45, col 9, ln 45-67, col 10, ln 1-7, col 11, ln 45-55, col 12, ln 1-20, col 12, ln 64-67, col 15, ln 43-46	21-26 ----- 1-20
Y	Martin et al. Comparison of the immunological responses and efficacy of gamma-irradiated V3526 vaccine formulations against subcutaneous and aerosol challenge with Venezuelan equine encephalitis virus subtype IAB. Vaccine 28:1031-1040; 13 November 2009 (13.11.2009) Abstract, page 1034, Table 1	1-11
Y	Degiorgi et al. Cryo-gamma radiation inactivation of bovine herpesvirus type-1. Radiation Physics and Chemistry 55 (1999) 469-471 Abstract, page 470, col 2	12-20
Y	US 2001/0018440 A1 (CHU et al.) 20 August 2001 (30.08.2001) para[0141]	11

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

30 November 2011 (30.11.2011)

Date of mailing of the international search report

14 DEC 2011

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774