Clarke, Modet & Cº

COLOMBIA

P-2347

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-123789- -00007-0000
Fecha: 2012-12-19 15:53:11 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYii Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 523 RESPUESTA Folios: 96

SUPERINTENDENCIA DE INDUS
DIVISION DE NUEVAS CREACIO
E. S. L

Re: Expediente No. **09.123.789**
Solicitud de patente a nombre de **INVIRAGEN, INC.**

Yo, DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN identificada como aparece al pie de mi firma, domiciliada en la Carrera 11 No. 86-53, piso 6, obrando como apoderada de la sociedad **INVIRAGEN, INC.,** domiciliada en Colorado, Estados Unidos de América, solicitante de la patente de la referencia, en respuesta al oficio No. 14208 notificado por fijación en lista el 14 de agosto de 2012, me permito manifestar:

1. Con fundamento en la facultad que confiere el artículo 34 de la Decisión 486 al solicitante para modificar la solicitud de patente en cualquier momento del trámite, presento junto con este memorial nuevo capítulo descriptivo donde se especificó la definición para las marcas pluronic F127 y similares.

Teniendo en cuenta el concepto técnico emitido por el Señor Superintendente Delegado para la propiedad intelectual GianCarlo Marcenaro Jiménez a la doctora Ana Maria Castro Wey, que da alcance a las comunicaciones No. 09-001524 y 09-012566, no se presenta tasa adicional, toda vez el anterior juego de reivindicaciones tenía 28 cláusulas y ahora solo tiene 23.

2. De la claridad de la solicitud

2.1 De las reivindicaciones

El título se modificó y quedará del siguiente tenor: **"MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA ESTABILIZAR VIRUS VIVOS ATENUADOS"**

El solicitante desea manifestar que es de destacar que las reivindicaciones modificadas como se presentan en este documento, corresponden casi de manera idéntica a aquellas admitidas en otras jurisdicciones, como por

ejemplo los Estados Unidos de América.

Los solicitantes respetuosamente se permiten decir que se encuentran en desacuerdo con los rechazos del examinador a las reivindicaciones 1, 12 y 22, no obstante en aras de agilizar el trámite, se modificaron las reivindicaciones y la descripción.

En efecto, las reivindicaciones han sido modificadas ahora para indicar dentro de las reivindicaciones independientes 1, 12 y 22 que la composición incluye uno o más copolímeros de bloque poli (óxido de etileno) y poli (óxido de propileno) (EO-PO), el uno o más EO-PO copolímeros de bloque incluyen poloxámero 407 (Pluronic F127), uno o más agentes proteicos, el uno o más agentes proteicos son una o más albúminas, y uno o más agentes de hidratos de carbono, los uno o más agentes de hidratos de carbono incluyen al menos uno o más de trehalosa y quitosano.

Adicionalmente, es deseo de los solicitantes manifestar su desacuerdo con que el término "uno o más" no está claro. El término "uno o más" puede significar que una formulación de la presente invención no se limita a sólo uno de los componentes de una lista de categorías dadas, sino que la formulación debe incluir al menos los tres componentes como se describe en las reivindicaciones pendientes: poloxámero 407 con o sin un adicional de copolímero en bloque EO-PO, una albúmina con o sin un carbohidrato adicional albúmina y uno de trehalosa y/o quitosano con o sin otro carbohidrato.

En este sentido, los solicitantes respetuosamente manifiestan que un experto en la técnica reconocerá que una composición puede incluir más de una de una clase de componentes y no sólo uno. Así las cosas, los solicitantes amablemente solicitan que estas objeciones sean retiradas, dado que las reivindicaciones ahora tienen los componentes especificados y establecer que es uno o más, para un conjunto limitado de opciones, no hace que las opciones sean ilimitadas, por el contrario, las opciones de combinación son muy limitadas y entendidas por un experto en la materia técnica.

En cuanto a que si la composición es líquida o sólida, amablemente los solicitantes se permiten manifestar que la consistencia de la composición no se reivindica porque la composición puede estar en forma acuosa o parcial o totalmente deshidratada o congelada

En ese orden de ideas, el solicitante desea indicar que una composición no necesariamente tiene que ser de una forma particular. La novedad de la composición como la reivindicada está en una de muchas formas. Así las cosas, los solicitantes no se encuentran de acuerdo con incluir las características de la reivindicación 4 dentro de la reivindicación 1 y solicitan amablemente retirar esta objeción de claridad.

En relación con las objeciones en cuanto a las antiguas reivindicaciones 2, 13 y 28 en cuanto al sustento para la composición reivindicada con respecto a los virus vivos atenuados como se reivindica, los solicitantes respetuosamente indican que los virus patógenos descritos en la presente solicitud se benefician de las composiciones reivindicadas en una forma inesperada (por ejemplo, la estabilización del virus) y la base para la selección de algunos de los componentes es dado que, como componentes individuales, demostraron facilitar o mantener el crecimiento de virus (véase, por ejemplo Campbell et al EE.UU. publicación de solicitud de patente 2005/0255121 A1 se expone en el Informe de Búsqueda Internacional) y no tener efectos adversos sobre el virus.

En ese orden de ideas, es necesario hacer énfasis sobre el hecho que las formulaciones actuales, reivindicadas por primera vez, tienen propiedades no reveladas e inesperadas de los componentes de combinación relacionados con la estabilización de virus vivos atenuados. Además, los virus como se reivindican tienen características similares que pueden ser protegidas de la degradación (estabilizado) por la formulación descrita y estas características no son sólo las propiedades de los flavivirus.

Aunado a lo anterior, también es importante señalar que todos los virus descritos de la presente solicitud son virus envueltos, por ejemplo, los virus de envoltura de ARN incluyen, pero no se limitan a, picornavirus, flavivirus, togavirus, coronavirus, filovirus, paramixovirus, ortomixovirus, bunyavirus, arenavirus, retrovirus y los virus con envoltura de ADN incluyen, pero no se limitan a, hepadnavirus, herpesvirus y poxvirus. Por lo tanto, amablemente se solicita que se retiren estas objeciones.

De otra parte, los solicitantes se permiten decir que no están de acuerdo con la afirmación del señor examinador para incluir los porcentajes en la reivindicación 1. Los solicitantes respetuosamente indican que las enmiendas a la reivindicación 1 superan las objeciones establecidas en relación con las reivindicaciones y proporcionan una nueva composición para la estabilización de virus vivos atenuados.

Por lo tanto, los solicitantes son de la opinión que las reivindicaciones modificadas no requieren rangos específicos porcentuales y piden amablemente que se retiren estas objeciones.

Las reivindicaciones 7, 19 y 25 han sido modificadas (las reivindicaciones 19 y 25 se modificaron y la reivindicación 7 se canceló con lo cual se supera la objeción en cuanto a la abreviatura "EO-PO".

Los solicitantes respetuosamente presentan el método reivindicado en la reivindicación pendiente 12 que es un método para la estabilización de virus vivos atenuados mediante la combinación del virus con las composiciones especificadas. Con el fin de agilizar el proceso, los solicitantes han modificado las reivindicaciones a recitar "*la obtención de uno o más virus vivos atenuados y combinar* ..." Los solicitantes respetuosamente manifiestan que las medidas adoptadas en la reivindicación de método incluyen "obtener" y "combinar." Por lo tanto, este rechazo debe ser eliminado.

En cuanto a la sugerencia del examinador para restringir la invención a la composición que constituye el objeto real de la invención, los solicitantes respetuosamente indican que las enmiendas realizadas en el capítulo reivindicatorio superan estas objeciones.

Los solicitantes respetuosamente indican que las reivindicación 16-18 cubren características adicionales en las pruebas, lo cual no es un resultado a alcanzar sino que es una mejora sobre la técnica.

1.2 De la memoria descriptiva

En cuanto a la objeción de la marca Pluronic F127, etc, se ha modificado la memoria descriptiva, específicamente los párrafos 00009, 00017, 00018, 00019, 00023, 00024, 00037, 00039, 00043, 00053, 00060, 00061, 00068, 00075, 00076,00077, 00078, 00079, 00080, 00081, 00082, 00086 y 00088 en aras de que incluyan el significado de estas marcas, así como algunos otros errores tipográficos.

2. Del Nivel inventivo

El señor examinador afirma que la presente solicitud carece de actividad inventiva en vista de D1 y D2, que son la técnica anterior más cercana dado que describen composiciones de virus con agentes tensioactivos, proteínas y agentes de hidratos de carbono.

Además, el señor examinador afirma que D1 y D2 cada uno afectan las reivindicaciones 1-14, 16-19 y 22-28.

(1) El examinador sostiene que D1 reporta una composición que comprende virus vivos atenuados, un poliol tal como sacarosa, trehalosa, sorbitol y manitol, un polímero tal como polietilenglicol y albúmina de suero y copolímero poypropyleneglycol como tensioactivo (véase la página 6, párrafo 14, página 50 y el ejemplo 1, párrafo 139).

Sobre este particular, los solicitantes respetuosamente manifiestan su desacuerdo con esta afirmación. No obstante, en aras de agilizar el proceso, los solicitantes han modificado las reivindicaciones para aclarar aún más el tema y distinguir con mayor claridad las reivindicaciones de lo expuesto en la técnica anterior.

En efecto, las reivindicaciones independientes 1, 12 y 22 ahora indican "uno o más vivo, los virus atenuados; copolímeros de bloque de uno o más poli (óxido de etileno) y poli (óxido de propileno) (EO-PO), el uno o más EO-PO bloque copolímeros incluyen poloxámero 407 (Pluronic F127); agentes de una o más proteínas, uno o más agentes proteicos son una o más albúminas, y uno o más agentes de hidratos de carbono, el agente de hidratos de carbono uno o más incluir al menos uno o más de trehalosa, y quitosano ... "

Los solicitantes respetuosamente se permiten señalar que D1 se encuentra dirigido a métodos para proporcionar congelación secado por pulverización de formulaciones para formar partículas estables liofilizadas para administración intranasal (por favor, ver el resumen de D1).

En este sentido, D1 reporta una cornucopia de polioles, polímeros y tensioactivos que pueden o no pueden ser empleados en los métodos descritos en el apartado 14 en la página 6 de esta anterioridad. Adicionalmente, el Ejemplo 1 que comienza en la página 49 de D1 describe tres formulaciones que tienen sacarosa, trehalosa, metionina, arginina y Pluronic F68; sacarosa, gelatina, metionina o Pluronic F68, o sacarosa, gelatina y Pluronic F68 de uso para rociar en congelación seca virus influenza.

No obstante, D1 no da a conocer composiciones de uso para estabilizar virus vivo atenuado. Además, el virus de la gripe no es un virus vivo atenuado de las reivindicaciones actuales y D1 no da a conocer que las composiciones reivindicadas requieren los tres componentes, uno o más hidratos de carbono, proteínas y uno o más uno o más copolímeros de bloque EO-PO. Además,

D1 no da a conocer que las formulaciones incluyen poloxámero 407 y uno o más de trehalosa o de quitosano, que corresponden a los elementos específicos de las reivindicaciones ahora modificadas.

Así las cosas, es importante señalar que los expertos en la técnica, no llegarían de manera evidente a las composiciones reivindicadas y métodos de la presente invención con solo las enseñanzas de esta anterioridad.

Además, las composiciones de D1 se encuentran dirigidas a los productos generados por los métodos de D1 (véase el resumen y los párrafos [0012] - [0018]) adecuadas para administración intranasal. Por lo tanto, los componentes de las formulaciones dadas a conocer por D1 se seleccionan para ese propósito. En este sentido, amablemente dirigimos la atención del señor examinador al párrafo [0068] de D1, donde se recita "*En los métodos de la invención, los polioles pueden proporcionar, por ejemplo, un agente incrementador de la viscosidad para reducir los efectos de la tensión de cizalla durante la pulverización. Los polioles pueden proporcionar barreras protectoras y las químicas a las partículas de polvo liofilizado de la invención*".

Por consiguiente, los polímeros se pueden introducir en las formulaciones de D1 como "*Las hebras lineales o ramificadas de los polímeros puede proporcionar, por ejemplo, el aumento de resistencia estructural a la partícula composiciones de la invención. Los polímeros se pueden aplicar como un protector y / o recubrimiento de liberación tiempo para el exterior de las partículas liofilizadas de la invención "y beneficio" reconstitución de partículas liofilizadas*". D1 preferiblemente selecciona "*gelatina hidrolizada*" de estas ventajas (véase el párrafo [0069] de D1).

En cuanto al tensioactivo, D1 enseña que "*Un agente tensioactivo puede aumentar la solubilidad de otros componentes de formulación para evitar la agregación o precipitación en concentraciones más altas*" (véase el párrafo [0070] de D1). En este sentido, es importante señalar que las reivindicaciones actuales difieren de lo divulgado en D1, así como también en los componentes incluidos en las formulaciones actualmente reivindicadas que se seleccionan para estabilizar los virus vivos atenuados. Las composiciones de la presente invención se pueden administrar por una variedad de modos y **no se refieren a formulaciones intranasales** como las de D1 (Véase los Ejemplos 1-4, las Figs. 1-4 y 6-7, y las Tablas 1-4 de la presente solicitud presentada originalmente).

En este sentido, es importante señalar que se observaron inesperados efectos de las composiciones reclamadas a partir de experimentos de comparación realizadas en paralelo con otras composiciones (Ver Ejemplo 5, Figs. 4-5 de la

presente solicitud) y controles. Por lo tanto, D1 no divulga o sugiere la invención aquí reivindicada.

En cuanto al documento D2, el señor examinador sostiene que D2 reporta una composición de virus vivo atenuado que comprende virus vivo atenuado, un poliol, un polímero y un agente tensioactivo en el que el poliol incluye sacarosa, trehalosa, sorbitol y manitol y los otros componentes (consulte la página 5, párrafo 16 a través de la página 7, párrafo 20, página 36, ejemplo 1, página 37-página 43, ejemplo 2).

Los solicitantes respetuosamente manifiestan su desacuerdo con esta afirmación. Los inventores respetuosamente indican que D2 en el párrafo 16 en la página 5 hasta el párrafo 20, en la página 7, proporciona una larga lista de posibles polioles, polímeros y tensioactivos. De hecho, las formulaciones descritas en D2 en los Ejemplos 1 y 2 proporcionan gelatina como polímero, F68 como el tensioactivo y sacarosa o rafinosa como los polioles.

En este sentido, es importante dirigir la atención del señor examinador sobre el hecho que D2 no da a conocer la composición reivindicada actualmente de uno o más virus atenuados vivos, uno o más de PO-EO copolímeros de bloque que incluyen poloxámero 407 (Pluronic F127 ®); agentes de una o más proteínas son uno o más albúminas, y uno o más agentes de hidratos de carbono incluyen trehalosa y/o quitosano en donde la composición es capaz de reducir la inactivación del virus vivo atenuado, elementos de las reivindicaciones independientes 1, 12 y 22. En ninguna parte de D2 es una composición similar descrita o sugerida.

Aunado a lo anterior, las reivindicaciones de D2 se encuentran dirigidas a "*métodos y composiciones para preservar materiales bioactivos en una matriz de espuma seca*" (ver el resumen de D2). Además, D2 reporta "*procesos de expansión de una formulación del material bioactivo y un poliol en una espuma seguido por secado de la espuma en una composición seca de la espuma estable*" (véase el resumen de la invención el párrafo [0011] de D2).

Además, esta anterioridad se refiere a una composición de espuma seca para el almacenamiento de una composición de virus en una espuma seca (véanse también los párrafos [0036], [0038], [0061]-[0069], [0074], [0111], los ejemplos y las reivindicaciones). Los polímeros descritos en la D2 se enseñan para proporcionar componentes estructurales en las composiciones de espuma seca (véase el párrafo [0019] de D2).

Con respecto a la membrana lipídica o la matriz vítrea, en el documento citado se describen los requisitos específicos de temperatura para la preparación de la espuma seca a partir de los lípidos de membranas (véase por ejemplo Resumen de la invención de D2).

Sobre este particular, es importante señalar que el documento D2 requiere un sólido que se forma (una espuma). De hecho, las formulaciones de D2 no corresponden a las formulaciones descritas en las reivindicaciones de la solicitud que están dirigidas a la estabilización de composiciones de virus atenuados vivos.

Además, la invención aquí reivindicada no alcanzaría los efectos deseados referenciados por el examinador en cuanto a los ejemplos 1 y 2 de la anterioridad D2, toda vez que de acuerdo con D2, la preparación y uso de formulaciones secas de espuma requieren Pluronic F68, gelatina, sacarosa y un tampón de metionina en sus formulaciones (véase, por ejemplo, los párrafos [0122] - [0125]; Ejemplo 1 y 2 de D2).

Así las cosas, la formulación que se especifica en las reivindicaciones independientes 1, 12 o 22 de la presente solicitud no se enseñan o sugieren en el documento D2.

El señor examinador afirma que la diferencia con la técnica anterior es que la presente solicitud utiliza la lactoalbúmina, albúmina de suero ... en lugar de gelatina utilizada en la técnica anterior.

Los solicitantes respetuosamente manifiestan que la técnica anterior utiliza **gelatina como un polímero** no como una proteína como lo hacen las reivindicaciones actuales de la presente invención y el efecto deseado de este componente en particular, en la técnica anterior, difiere de las reivindicaciones actuales.

En efecto, la presente solicitud describe que "no es probable que la estabilización mejorada de virus en presencia de albúmina (una proteína de la composición reivindica) se deba a la función como una proteína portadora general: otras proteínas tales como gelatina y lactoferrina no mejoran la estabilidad del virus" (véase el párrafo [00054] de la solicitud presentada).

Por lo tanto, **la gelatina de la técnica anterior no es un sustituto en la composición actualmente reivindicada**, ya que no funcionó. Además, también era conocido en la técnica en el momento de presentar la presente

invención que "la gelatina pueden causar reacciones alérgicas en niños vacunados y podría ser una de las causas relacionadas con la vacuna de eventos adversos" (véase el párrafo [00045] de la presente solicitud), que podrían comprometer sus usos potenciales en composiciones de vacunas relacionadas de la presente solicitud. Por lo tanto, la gelatina de D1 o D2 se aparta de las presentes formulaciones.

De otra parte, el señor examinador sostiene que D1 y D2 también indican la concentración para esos componentes. Los solicitantes respetuosamente se encuentran en desacuerdo con estas afirmaciones.

Como se presentó anteriormente, D1 y D2 no revelan las composiciones reivindicadas. Las enseñanzas respecto a cualquiera de las concentraciones de los agentes son específicas para las formulaciones descritas por D1 que proporcionan una amplia gama de concentraciones para todos los agentes en una gran lista.

Por lo tanto, es claro que D1 y D2 no describen, ni muestran ni sugieren al un experto en la técnica las formulaciones de la presente invención. **La combinación de una espuma liofilizada y una congelación de aerosol para administración intranasal no se presenta en las formulaciones actualmente reivindicadas para estabilizar un virus vivo, atenuado**.

Además, tanto D1 como D2 se refiere a formulaciones de virus de influenza no formulaciones para los virus vivos atenuados alegadas (ver las reivindicaciones 2, 13, 21 y 28 de las actuales reivindicaciones).

En conclusión, dadas las enseñanzas de D1 y D2, el experto en la técnica no estaría motivado para generar la composición reivindicada actualmente utilizando albúmina en lugar de gelatina. Además, como se presentó anteriormente, el efecto logrado por las composiciones de la invención en la reducción de la inactivación de un virus vivo y atenuado no se espera por un experto en la técnica en el momento de la presentación de la presente solicitud.

Por lo tanto, por las razones presentadas anteriormente, es claro que la presente invención cumple con los requisitos de patentabilidad frente a las enseñanzas de D1 y D2, solas o en combinación, dado que D1 proporciona métodos y composiciones para la administración intranasal de virus atenuados vivos de influenza y D2, proporciona la generación de formulaciones secas de espuma, y fallan para combinarse para formar las composiciones actualmente reivindicadas.

Habiendo atendido cabalmente las objeciones presentadas por ese despacho y teniendo en cuenta que las reivindicaciones presentadas como modificación con nuestro memorial del 20 de febrero de 2012 no fueron tenidas en cuenta, atentamente solicitamos se conceda el privilegio de patente de invención a la solicitud en estudio o si el señor examinador considera que subsisten razones para objetar la presente invención, rogamos expedir otro examen de fondo con los debidos motivos y razones que sustenten su objeción con el fin de que nuestro mandante tenga la posibilidad de exponer sus argumentos con base en la interpretación de los artículos 45 de la Decisión 486 -el cual otorga la facultad al examinador para emitir los exámenes de fondo-, 35 y 59 del Código Contencioso Administrativo que señala que: "habiéndose dado oportunidad a los interesados para expresar sus opiniones, y con base en las pruebas e informes disponibles, se tomará la decisión que será motivada al menos en forma sumaria si afecta a particulares" y "(..) deberá proferirse la decisión definitiva. Esta se motivará en sus aspectos de hecho y de derecho, y en los de conveniencia si es el caso", respectivamente (El subrayado es nuestro).

En consecuencia, solicitamos a ese despacho pronunciarse en relación con todos los argumentos presentados en este memorial dando estricta aplicación al principio del debido proceso consagrado en el artículo 29 de la Constitución Nacional

Señor Superintendente,

DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN
CC. 41.654.882
TP 20824 CSJ
notificaciones@clarkemodet.com.co

ANEXO 1

Bibliografía que muestra algunas propiedades de los copolímeros de bloque.
Para el Pluronic ® poloxámero 188 y el poloxámero 407

BASF
The Chemical Company

Safety data sheet

Pluronic® F 68 NF Prill Poloxamer 188

1. Substance/preparation and company identification

Company
BASF CORPORATION
100 Campus Drive
Florham Park, NJ 07932, USA

24 Hour Emergency Response Information
CHEMTREC: 1-800-424-9300
BASF HOTLINE: 1-800-832-HELP

Molecular weight: 8,400 g/mol
Synonyms: Polyoxypropylene-polyoxyethylene Block Copolymer

2. Composition/information on ingredients

CAS Number	Content (W/W)	Chemical name
9003-11-6	100.0 %	Methyl-oxirane polymer with oxirane
128-37-0	0.01 %	BHT

3. Hazard identification

Emergency overview

CAUTION: MAY CAUSE EYE, SKIN AND RESPIRATORY TRACT IRRITATION.
INGESTION MAY CAUSE GASTRIC DISTURBANCES.
Wear NIOSH-certified chemical goggles.
Wear a NIOSH-certified (or equivalent) organic vapour/particulate respirator.
Use with local exhaust ventilation.
Product is manufactured with the addition of 100 ppm of BHT (CAS 128-37-0) as antioxidant.
Wear chemical resistant protective gloves.
Eye wash fountains and safety showers must be easily accessible.

Potential health effects

Primary routes of exposure
Routes of entry for solids and liquids include eye and skin contact, ingestion and inhalation. Routes of entry for gases include inhalation and eye contact. Skin contact may be a route of entry for liquified gases.

Medical conditions aggravated by overexposure:
Data available do not indicate that there are medical conditions that are generally recognized as being aggravated by exposure to this substance/product.
See MSDS section 11 - Toxicological information.

4. First-aid measures

General advice:
Remove contaminated clothing.

If inhaled:
If difficulties occur after dust has been inhaled, remove to fresh air and seek medical attention.

If on skin:
Wash thoroughly with soap and water.

If irritation develops, seek medical attention.

If in eyes:
Wash affected eyes for at least 15 minutes under running water with eyelids held open.

Seek medical attention.

If swallowed:
Rinse mouth and then drink plenty of water. Do not induce vomiting. Immediate medical attention required.

Note to physician

Treatment:	Treat according to symptoms (decontamination, vital functions), no known specific antidote.

5. Fire-fighting measures

Flash point: approx. 260 °C (ASTM D92)

Suitable extinguishing media:
dry extinguishing media, foam

Unsuitable extinguishing media for safety reasons:
carbon dioxide

Hazards during fire-fighting:
harmful vapours
Evolution of fumes/fog. The substances/groups of substances mentioned can be released in case of fire.

Protective equipment for fire-fighting:
Wear a self-contained breathing apparatus.

Further information:
The degree of risk is governed by the burning substance and the fire conditions. Contaminated extinguishing water must be disposed of in accordance with official regulations.

NFPA Hazard codes:
Health : 1 Fire: 1 Reactivity: 0 Special:

6. Accidental release measures

Personal precautions:
Avoid dust formation. Use personal protective clothing.

Environmental precautions:
Contain contaminated water/firefighting water. Do not discharge into drains/surface waters/groundwater.

Cleanup:
Avoid raising dust.

For small amounts: Pick up with suitable appliance and dispose of.
For large amounts: Contain with dust binding material and dispose of.

7. Handling and storage

Handling

General advice:
Breathing must be protected when large quantities are decanted without local exhaust ventilation.

Protection against fire and explosion:
Avoid dust formation. Take precautionary measures against static discharges.

Storage

General advice:
Keep container tightly closed and dry; store in a cool place.

Storage incompatibility:
General: Segregate from strong oxidizing agents. Segregate from acids and bases.

8. Exposure controls and personal protection

Components with workplace control parameters

BHT

ACGIH	TWA value 2 mg/m3	Inhalable fraction and vapor ;

Advice on system design:
Provide local exhaust ventilation to control dust.

Personal protective equipment

Respiratory protection:
Respiratory protection may not be required under normal operating conditions if adequate ventilation is provided.

Hand protection:
Chemical resistant protective gloves

Consult with glove manufacturer for testing data.

Eye protection:
Tightly fitting safety goggles (chemical goggles).

Body protection:
Body protection must be chosen based on level of activity and exposure.

General safety and hygiene measures:
Wear protective clothing as necessary to minimize contact. Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice. Keep away from food, drink and animal feeding stuffs. Handle in accordance with good industrial hygiene and safety practice.

9. Physical and chemical properties

Form:	prills, pastilles, cast solid
Odour:	mild, of polyol

Colour:	white to cream colour	
pH value:	6 - 7	
Freezing point:	approx. 52 °C	(1,013 hPa)
Bulk density:	1,050 kg/m3	
Viscosity, dynamic:	19 mPa.s	(77 °C)
Solubility in water:		soluble

10. Stability and reactivity

Hazardous reactions:
In spite of the dedusting carried out for reasons of industrial health a dust explosion hazard can not be excluded.

Decomposition products:
Hazardous decomposition products: No hazardous decomposition products if stored and handled as prescribed/indicated.

Corrosion to metals:
No corrosive effect on metal.

11. Toxicological information

Acute toxicity

Oral:
LD50/rat: > 2,000 mg/kg

Skin irritation:
rabbit: non-irritant (Draize test)

Eye irritation :
rabbit: non-irritant (Draize test)

12. Ecological information

Environmental fate and transport

Biodegradation:
Evaluation: is partially eliminated in sewage treatment plants

Environmental toxicity

Acute and prolonged toxicity to fish:
golden orfe/LC50 (96 h): > 100 mg/l

Acute toxicity to aquatic invertebrates:
EC50 (48 h): > 100 mg/l

Toxicity to aquatic plants:
EC50 (72 h): > 100 mg/l

Toxicity to microorganisms:

Inhibition of degradation activity in activated sludge is not to be anticipated during correct introduction of low concentrations.

Other ecotoxicological advice:
The product has not been tested. The statement has been derived from products of a similar structure and composition.

13. Disposal considerations

Waste disposal of substance:
Dispose of in accordance with national, state and local regulations.

Container disposal:
Dispose of in a licensed facility. Recommend crushing, puncturing or other means to prevent unauthorized use of used containers.

14. Transport information

Land transport
USDOT

Not classified as a dangerous good under transport regulations

Sea transport
IMDG

Not classified as a dangerous good under transport regulations

Air transport
IATA/ICAO

Not classified as a dangerous good under transport regulations

15. Regulatory information

Federal Regulations

Registration status:
TSCA, US released / listed

OSHA hazard category: Not hazardous

SARA hazard categories (EPCRA 311/312): Not hazardous

State regulations

State RTK

CAS Number	Chemical name	State RTK
128-37-0	BHT	MA, NJ, PA

CA Prop. 65:
THIS PRODUCT CONTAINS A CHEMICAL(S) KNOWN TO THE STATE OF CALIFORNIA TO CAUSE CANCER AND BIRTH DEFECTS OR OTHER REPRODUCTIVE HARM.

16. Other information

HMIS III rating
Health: 1 Flammability: 1 Physical hazard: 0

HMIS uses a numbering scale ranging from 0 to 4 to indicate the degree of hazard. A value of zero means that the substance possesses essentially no hazard; a rating of four indicates high hazard.

Local contact information
prod_reg@basf.com

Pluronic is a registered trademark of BASF Corporation or BASF AG
IMPORTANT: WHILE THE DESCRIPTIONS, DESIGNS, DATA AND INFORMATION CONTAINED HEREIN ARE PRESENTED IN GOOD FAITH AND BELIEVED TO BE ACCURATE , IT IS PROVIDED FOR YOUR GUIDANCE ONLY. BECAUSE MANY FACTORS MAY AFFECT PROCESSING OR APPLICATION/USE, WE RECOMMEND THAT YOU MAKE TESTS TO DETERMINE THE SUITABILITY OF A PRODUCT FOR YOUR PARTICULAR PURPOSE PRIOR TO USE. NO WARRANTIES OF ANY KIND, EITHER EXPRESSED OR IMPLIED, INCLUDING WARRANTIES OF MERCHANTABILITY OR FITNESS FOR A PARTICULAR PURPOSE, ARE MADE REGARDING PRODUCTS DESCRIBED OR DESIGNS, DATA OR INFORMATION SET FORTH, OR THAT THE PRODUCTS, DESIGNS, DATA OR INFORMATION MAY BE USED WITHOUT INFRINGING THE INTELLECTUAL PROPERTY RIGHTS OF OTHERS. IN NO CASE SHALL THE DESCRIPTIONS, INFORMATION, DATA OR DESIGNS PROVIDED BE CONSIDERED A PART OF OUR TERMS AND CONDITIONS OF SALE. FURTHER, YOU EXPRESSLY UNDERSTAND AND AGREE THAT THE DESCRIPTIONS, DESIGNS, DATA, AND INFORMATION FURNISHED BY BASF HEREUNDER ARE GIVEN GRATIS AND BASF ASSUMES NO OBLIGATION OR LIABILITY FOR THE DESCRIPTION, DESIGNS, DATA AND INFORMATION GIVEN OR RESULTS OBTAINED, ALL SUCH BEING GIVEN AND ACCEPTED AT YOUR RISK.
END OF DATA SHEET

Poloxamers (2)

Lutrol® F 127 (Poloxamer 407).

B. Fussnegger

› Introduction

The poloxamers are a group of surface active compounds widely used in the pharmaceutical industry. As newly developed active drugs are often water insoluble substances, their formulation together with the interest to design new drug dosage forms in order to increase the effectiveness of already existing formulations, promoted a variety of delivery vehicles such as controlled or sustained release systems, gels, microemulsions and nanoparticles. These dosage forms support the claim for enhanced solubility and bioavailability, for lengthened contact at specifidy selected sites in the body, combined with the reduction in quantity of applied drug **[1]**. All these aspects could optimize systemic and minimize side effects of active drugs.

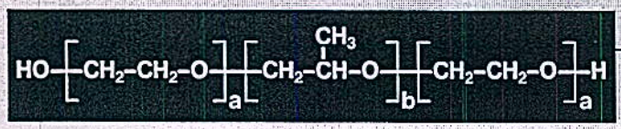
› Structure

The poloxamers are described as block polymers of the type ABA, consisting of a central, hydrophobic block of polypropylene oxide, which is edged by two hydrophilic blocks of polyethylene oxide. The polymers are derived from the sequential polymerization of propylene oxide and ethylene oxide. A general formula is shown in **figure 1.**

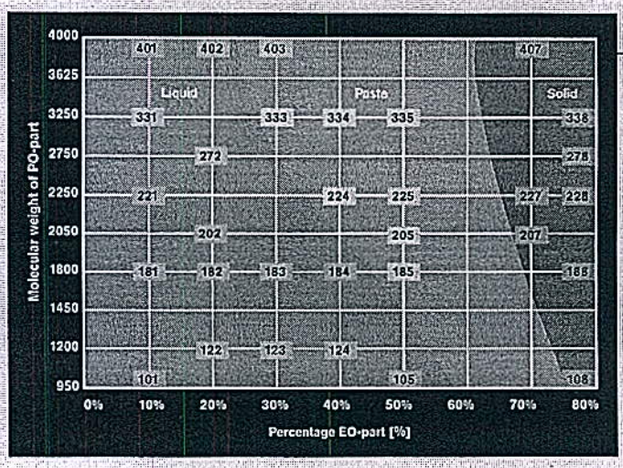
Due to the possibility to combine blocks of different molecular weights, the properties of the resulting polymers vary in a wide range. The poloxamer grid **(see figure 2)** demonstrates the spectrum of the molecular weight, different appearances (liquid, paste and solid) and variations in the hydrophilic or hydrophobic character of the individual compounds. **Lutrol F 127** has an average molecular weight of about 12200. The polyoxyethylene units represent about 73% of the molecular weight whereas that one of polyoxypropylene stands for about 27%. Due to the composition Lutrol F 127 is readily water soluble.

› Pharmcopoeial Situation

Up to now the products for pharmaceutical use have been characterized on the one hand in the family-monograph 'Poloxamers' in the USP/NF, on the other hand in individual monographs cited in JPE (Japanese Pharmaceutical Excipients, 1993). In the 'Third (2000) Supplement' to the 'Third (1997) edition of the European Pharmacopoeia' a family-monograph on 'Poloxamers' was published. In contrast to the USP/NF eight different products are listed there **[2]**.



(Figure 1)



Poloxamer grid. (Figure 2)

The latest edition of the American Pharmacopoela USP24/NF19 harmonizes the monomer contents in terms of ethylene oxide, propylene oxide and 1.4 - dioxane to the figures published in Ph.Eur.

› General Properties of Lutrol F 127

The most important property for its application in pharmaceutical dosage forms is the capability of Lutrol F 127 to form thermo-reversible gels the rheological properties of which largely depend on their concentration. Dilute aqueous solutions display Newtonian flow. Above concentrations of 10% it changes to plastic flow with a pronounced change in flowability and viscosity.
Figure 3 shows the temperature influence on the viscosity of aqueous poloxamer 407 solutions at low temperatures, whereas **figure 4** demonstrates the influence of the polymer concentration on the viscosity at constant temperatures. Both figures are taken from literature **[3]**.

Due to the reversibility of the thermoviscosimetric behaviour of Lutrol F 127, gels could be prepared either by dissolving the polymer at temperatures exceeding 70°C or in the cold at around 5°C to 10°C. The latter possibility is always recommended in cases of a heat sensitive active. The sol-gel transition temperature of aqueous solutions of Lutrol F 127 ranges from around 15°C to 25°C at polymer concentrations exceeding 16% and is highly influenced by co-formulated components such as organic or inorganic salts, PEGs, solvents, etc. Certain salts with multivalent anions, at characteristic concentrations, prevent poloxamer 407 solutions completely from forming gels **[4]**.

In contrast to Lutrol F 68 with its property to form micelles, this capability is not known of Lutrol F 127. Its gelling however can be attributed to structures formed by hydrophobic interactions of its polypropylene oxide units. This effect has been widely used with actives to modify their dissolution properties and stability.

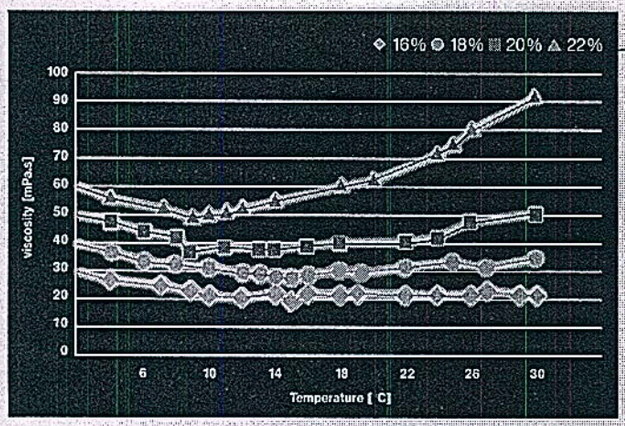
› Applications of Lutrol F 127

Lutrol F 127 and its effects on formulated actives

[5] When Indomethacin was formulated in gels containing Poloxamer 407 at concentrations from 0–30% wt./vol the hydrolysis rates of the active were slower in the gels than in a buffer solution alone. It is predicted that at pH 7.00 and 20°C, the time required for 10% indomethacin degradation is 2.7 years in 20% wt./vol. Poloxamer 407 gel, while it is 48 days in the aqueous solution.

The degradation of indomethacin in different gel systems was studied **[6]** at different concentrations of each gelling agent at pH 10.2 and at 35°C and 45°C. The results indicate that no protection against indomethacin hydrolysis was provided by the viscous carbopol and CMC-sodium gels. Protection was observed however in case of nonionic poloxamer 407 gels, which consists of structured three-dimensional hydrophobic areas, where actives can be enclosed and thus sheltered from hydrolysis.

000018



Viscosity of 16%, 18%, 20% and 22% aqueous solutions of poloxamer 407 as function of temperature. (Figure 3)

To increase or to modify the release characteristic of poorly soluble drugs solid dispersions were obtained by melting Lutrol F 127 and adding the actives to the molten compound. In a second step tablets were formulated by blending these solid dispersions with e.g. Methocel K15M, Avicel PH101 and Magnesium stearate. The blends are compressed to obtain modified-release formulations for oral administration. Examples of active ingredients whose solubility and therapeutic effectiveness can be improved with the formulations are among others cisapride, cyclosporin, diclofenac, felodipine, ibuprofen, indomethacin, nicardipine, nifedipine, terfenadine and theophylline **[7]**.

The in vitro release characteristics of various actives depend on the parameters poloxamer concentration, temperature and pH. When diclofenac and hydrocortisone were used as model drugs and the release rates from Poloxamer 407 gels were studied in an in vitro membraneless release model **[8]**, the release rate decreases with increasing Poloxamer 407 concentration, but increases with increasing temperature. A linear relation was obtained between the apparent release rate and the initial drug concentration. The release of diclofenac was largely dependent upon the gel pH and was maximal at pH around 7, whereas in the case of hydrocortisone, no pH-dependency was observed. Thus, the drug is released by diffusion through the structured aqueous channels of the gel matrix. Further, among the various factors affecting drug release, the pH in gel formulations appears to be very important when the formulated drug is a weak acid or base.

Lutrol F 127 in treatment of open wound and in burn wound coverings

Early wound closure techniques resulted in an improved survival rate even for patients with majority of percentage body surface area burns. The use of poloxamer preparations for burn wound coverings and treatment of open wounds with poloxamer 407 based gels with or without the addition of bacteriocidal or bacteriostatic agents or debriding agents, growth factors, and hemostatic agents was reviewed some time ago **[9]**.

When compared to films, gel formulations are advantageous due to their capability to flow into caverns and follow the contours of a wound configuration, transporting the additives as close as possible to the damaged tissue surface.

Formulations of water-soluble topical preparations of epidermal growth factor (EGF) for the treatment of open wound and burn based on Poloxamer 407 containing various stabilizers have been evaluated and the pharmacological activity of gel preparations was determined with wound models **[10]**. As all the additives studied resulted in deleterious effects on EGF stability aqueous topical preparations of EGF were formulated with Poloxamer 407 as a gel base in saline in combination with gelatin or amastatin as a protease inhibitor. The pharmacological effect of EGF gel studied with open wound model in mice revealed significant higher healing effects compared to the gel without a protease inhibitor.
The EGF gel made of Poloxamer 407 containing a protease inhibitor would be a promising aqueous topical preparation for EGF.

The enhancement in wound healing by transforming growth factor-beta.1 (TGF-.beta.1) was studied by **[11]** in relation to the release characteristics from different topical delivery systems such as phosphate-buffered saline, a poloxamer 407 gel, DuoDERM hydroactive paste, and poly(ethylene oxide) hydrogel. When the release of 125Iodine-labeled TGF-.beta.1 from carriers was measured in full-thickness wounds in rats and the healing of the wounds was analyzed by histological and wound area measurements it became obvious that these effects were most prominent when TGF-.beta.1 was formulated with a poloxamer 407 gel formulation, which provided the most sustained release of TGF-.beta.1. The finding that the enhancement in wound healing by TGF-.beta.1 was significantly dependent on the carrier used for its topical delivery to the wound site shows the importance of using adequate delivery systems when growth factors but also other proteins are used to enhance wound repair and wound healing.

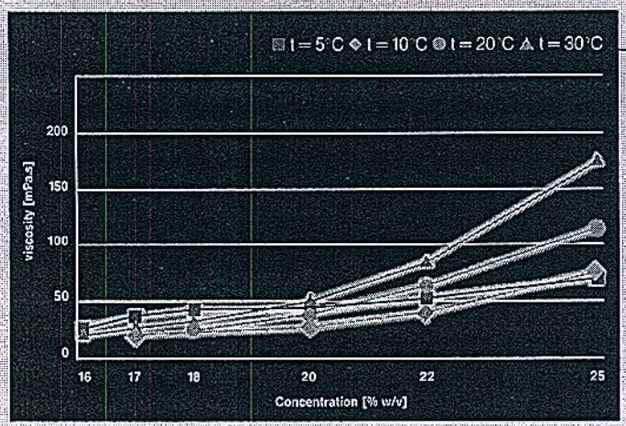
In **[12]** topical preparations such as hydrophilic ointments for local treatment of deep skin burns were evaluated. Local anesthetics carbizocaine and lidocaine were used as drugs. Tests were performed among others using Poloxamer 407 as gel forming component.

Lutrol F 127 in dental formulations and oral rinses

Not only a variety of dental formulations, oral rinses and dentifrices are known to be formulated using Lutrol F 127 but also semi-solid tetracycline-containing formulations based on Poloxamer 407 were prepared for the treatment of periodontitis by direct periodontal intrapocket administration. The formulations are easily administered by a syringe equipped with a needle appropriate for intrapocket delivery. They are characterized by a sol-gel transition, becoming semi-solid once in the periodontal pocket and, finally, they represent biocompatible formulations eliminated from the body by normal routes **[13]**.

Lutrol F 127 in ophthalmic formulations

Formulations containing poloxamer 407 for ophthalmic use are well documented not only in patent literature such as **[14]**, where the ophthalmic drug delivery with thermoreversible polyoxyalkylene



Viscosity of aqueous solutions thermostatized at 5°C, 10°C, 20°C and 30°C as a function of copolymer concentration. (Figure 4)

gels adjustable for pH is claimed. The composition is a liquid at room temperature or below and a gel with a desired osmolality at body temperature. For example, a solution containing neomycin sulfate 0.55%, polymyxin B sulfate 0.12%, glycerin 0.7%, poloxamer 407 19.0%, methylparaben/propylparaben 0.1%, and Tris-HCl buffer 79.53% exhibited gelation at approximately 33°C and osmolality of approximately 650 mOsm/kg in the liquid state at pH 7.5 and calculated osmolality in the gelled state was approximately 290 mOsm/kg.

The role of tear deposits on hydrogel contact lenses-induced bacterial keratitis and possibilities for its prevention was determined in **[15]**. Among other polymers of poloxamer series tested, poloxamer 407 decreased Pseudomonas aeruginosa adherence to new hydrophilic contact lenses by 94%. This poloxamer is non-toxic, stable, water-soluble, and lacks antimicrobial activity. Thus, it could be used to prevent bacterial attachment to contact lenses and, may be therefore, a potential candidate to reduce the incidence of contact lens-induced keratitis.

Lutrol F 127 and the formulation of nanoparticles

Some years ago solid lipid nanoparticles (SLN) have been developed as new drug delivery systems. Although many particulate drug carriers, such as microspheres, liposomes, niosomes, emulsions, etc., have been introduced, they have some disadvantages, e.g., low efficiency of incorporation, poor stability and lack of reproducibility. Meanwhile, SLN as new drug delivery systems entrap drugs with a high efficiency and a good reproducibility. Also, small size SLN can circulate in blood for a prolonged time. A preparation of ketoprofen-incorporated solid lipid nanoparticles (Keto-SLN) by ultrasonication and microfluidization and their evaluation was performed in **[16]**. Keto-SLN was evaluated by the measurement of particle size and zeta-potential, efficiency of entrapment, sedimentation volume, and in vitro release pattern. The mean particle size was about 0.1 µm, and the size was dependent on the type and amount of the emulsifier. Zeta-potential was negative, entrapment efficacy was very high and stability was good for at least 60 days in the respect of particle size and sedimentation. The analgesic effect was also comparable to that of ketoprofen-loaded suspension. Therefore, keto-SLN delivery systems can be used for anti-inflammatory agents such as ketoprofen and in addition for other actives such as anticancer drugs, analgesics, etc.

Solid lipid nanoparticles (SLN) as alternative i.v. colloidal drug carriers were produced by high pressure homogenization of melted lipids. In order to reduce the phagocytic uptake by the reticuloendothelial system (RES) after i.v. injection their surface was modified **[17]** by using hydrophilic polymers such as Poloxamer 407. Viability determinations revealed the SLN to be 10 fold less cytotoxic than polylactide nanoparticles and 100 fold less than Bucyanoacrylate particles. Poloxamer 407 surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN) for drug targeting purposes as alternative colloidal carrier systems for controlled drug delivery are discussed in **[18]**. The surfactant polymers are directly incorporated in the production process. Production parameters were optimized to obtain nanoparticle sizes required for the envisaged targets, e.g. < 150 nm for endothelial cells. Drug loading capacities of 9.8% of the lipid matrix were obtained, prolonged in vitro drug release was achieved over 5 wk (prednisolone). SLN of optimized composition proved to be physically stable during sterilization (autoclaving) and on long-term as aqueous dispersion.

The influence of coatings with surfactants such as poloxamer 407 on the body distribution of nanoparticles after intravenous injection to rats was studied in **[19]**. After i.v. injection, nanoparticles or other colloidal drug carriers such as liposomes are rapidly removed from the blood by the reticuloendothelial system (RES) and distributed in the body organs. Since it was shown that the surface properties have an important influence on the body distribution.

An evaluation of Poloxamer 407 gels alone or in combination with polylactic-co-glycolic acid (PLGA) nanoparticles containing peptides or proteins for parenteral delivery was performed using insulin as active **[20]**. In vitro techniques were applied and in vivo evaluations were performed after s.c. application. The in vivo results demonstrated that higher concentrations of poloxamer 407 in the gel resulted in slower release of insulin from the matrices, independent of the vehicle used. Compared to an insulin solution, in vivo administrations of insulin loaded to a poloxamer 407 gel resulted, in a slower and more prolonged hypoglycemic effect of insulin which was inverse proportional to the polymer concentration. Poloxamer 407 gels containing insulin-PLGA nanoparticles had the most long-lasting hypoglycemic effects of all formulations. This in vitro and in vivo study revealed that gel formulations containing either drug or drug-nanoparticle formulations could be useful for the preparation of controlled delivery systems for peptides and proteins having short half-lives.

Lutrol F 127 in combination with gel-forming polymers

The development of liquid formulations, thermogelling at the administered site, is of increasing interest. This includes e.g. drug delivery systems for parenteral use. When injected i.m. the formulation forms a depot for the controlled release of drug by gelling at body temperature. The addition of F 68 strongly influenced the thermo-rheological properties of F 127 formulations. In contrast to the effect of common used salts (e. g. NaCl) the addition of F 68 to F 127 formulations resulted in an increase of the sol-gel-transition temperature, probably due to the formation of mixed micelles **[21]**. Further arguments for the use of these polymers are their solubilizing capacity and the good compatibility with drugs.

> References

[1] R. Schmolka; Polymer Controlled Drug Delivery (1991), 139–214, CRC, USA.

[2] European Pharmacopoeia, 3rd edition 1997, Third Supplement 2000, 1083–85.

[3] V. Lenaerts, C.Triquenaux, F.Riegl-Falson, P. Couvreur, Int. J.Pharmaceutics, 39 (1987), 121–127.

[4] Pandit, Nivedita K.; Lusaks, Justin, Int. J. Pharm. (1996), 145(1,2), 129–136.

[5] Tomida, Hisao; Kuwada, Noriko; Kiryu, Setsuo, Acta Pharm. Suec. (1988), 25(2), 87–96.

[6] Benjamin, Hanan, Ismail, Fatma; Ghaly, Ghaly M., Khalafallah, Nawal; Alexandria J. Pharm. Sci. (1994), 8(1), 13–23.

[7] Clancy, Maurice Joseph Anthony; Cumming, Kenneth Iain; Myers, Michael, Elan Corp Plc, Ire., WO 98-IE39 980701.

[8] Tomida, Hisao; Shinohara, Mariko; Kuwada, Noriko; Kiryu, Setsuo, Acta Pharm. Suec. (1987), 24(5), 263–72.

[9] Henry, Raymond L.; Schmolka, Irving R.; Crit. Rev. Biocompat. (1989), 5(3), 207–30.

[10] Lee, Yoo-Cheol; Park, Eun-Seok; Chi, Sang-Cheol; Yakche Hakhoechi (1995), 25(3), 177–84.

[11] Pudakkatron, Pauli A.; Tavardzik, Daniel R.; Ranchalis, Jane E; Pankey, Susan C., Reed, May J., Gombotz, Wayne R.; J. Surg. Res. (1995), 58(3), 321–329.

[12] Duckova, Katarina; Kucera, Josef; Acta Fac. Pharm. Univ. Comenianae (1990), 44, 19–42.

[13] Esposito, E., Carotta, V., Scabbia, A., Trombelli, L., D'Antona, P., Menegatti, E., Nastruzzi, C.; Int. J. Pharm. (1996), 142(1), 9–23.

[14] Viegas, Tacey X.; Reeve, Lorraine E.; Levinson, Robert S; US 5300295 A 940405.

[15] Portales, Maria; Refojo, Miguel F; Acov. Exp. Med. Biol. (1994), 350.

[16] Baek, Myoung Ki; Lee, Sang Young; Jee, Ung Kil; Yakche Hakhoechi (1996), 26(4), 245–256.

[17] Mueller, R. H.; Maassen, S.; Weyhers, H. Mehnert, W.; J. Drug Targeting (1996), 4(3), 161–170.

[18] Mueller, Rainer H.; Mehnert, Wolfgang; Lucks, Joern Stefan; Schwarz, Cora; Zur Muehlen, Annette; Weyhers, Holger; Freitas, Chrysanthia; Ruehl, Doerte; Eur. J. Pharm. Biopharm. (1995), 41(1), 62–9.

[19] Kreuter, J.; Clin. Mater. (1993), 13(1–4), 131–4.

[20] J. M.Banchallo, M. Morishita, K. Takayama, T. Nagai; Int. J. Pharmaceutics, 184, (1999), 189–199.

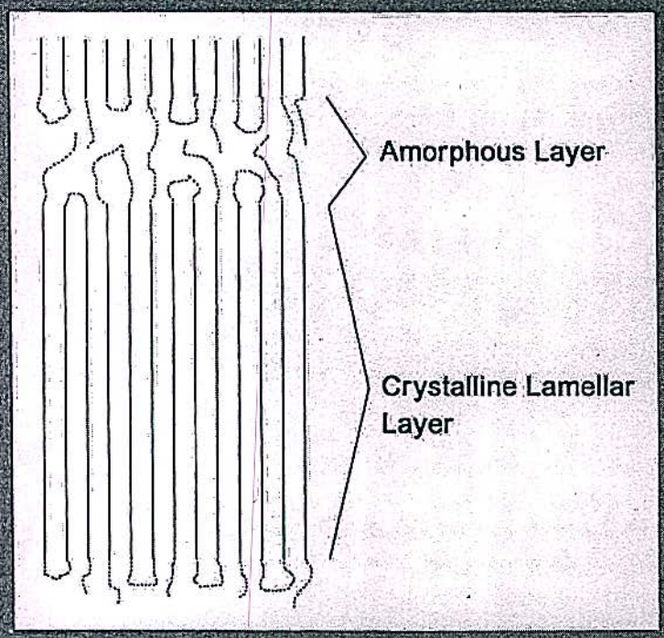
[21] F. Ruchatz, S. Lang, H. Reich, B. Fussnegger; Poster session CRS, 1998.

SCI
TP994
.N66
1996

surfactant science series
volume 60

NONIONIC SURFACTANTS

Polyoxyalkylene Block Copolymers



edited by
Vaughn M. Nace

000021

NONIONIC SURFACTANTS

Polyoxyalkylene Block Copolymers

edited by
Vaughn M. Nace
The Dow Chemical Company
Freeport, Texas

Marcel Dekker, Inc. New York • Basel • Hong Kong

000022

Library of Congress Cataloging-in-Publication Data

Nonionic surfactants: polyoxyalkylene block copolymers / edited by Vaughn M. Nace.
p. cm. – (Surfactant science series ; v. 60)
Includes index.
ISBN 0-8247-9700-0 (hardcover: alk. paper)
1. Surface active agents. 2. Block copolymers. I. Nace, Vaughn Mark. II. Series.
TP994.N66 1996
668'.1–dc20 96-2619
CIP

The publisher offers discounts on this book when ordered in bulk quantities. For more information, write to Special Sales/Professional Marketing at the address below.

This book is printed on acid-free paper.

Copyright © 1996 by Marcel Dekker, Inc. All Rights Reserved.

Neither this book nor any part may be reproduced or transmitted in any form or by any means, electronic or mechanical, including photocopying, microfilming, and recording, or by any information storage and retrieval system, without permission in writing from the publisher.

Marcel Dekker, Inc.

270 Madison Avenue, New York, New York 10016

Current printing (last digit):

10 9 8 7 6 5 4 3 2 1

PRINTED IN THE UNITED STATES OF AMERICA

000023

6

Toxicology of Polyoxyalkylene Block Copolymers

STEPHEN C. RODRIGUEZ* Department of Toxicology, Stonybrook Laboratories Inc., Princeton, New Jersey

EDWARD J. SINGER Technical Consultant, Environmental Science & Toxicology, Belle Mead, New Jersey

I. Introduction 212
- A. Structure 212
- B. Synthesis 213
- C. Structural variations 213
- D. Structurally-related properties 213
- E. Nomenclature 214

II. In Vivo Mammalian Toxicology Studies 214
- A. Biological effects of short-term exposure (acute, subacute) 214
- B. Biological effects of long-term exposure 221
- C. Metabolic studies 223

III. Other Biological Studies 223
- A. Predictive tests for mutagenicity and genotoxicity 223
- B. Other studies demonstrating, predicting, or related to effects on humans 224

IV. Structure-Activity Relationships (SAR) 228

V. Summary 230

VI. Appendix 231

References 240

* *Current affiliation*: Central Research, Rhône-Poulenc Rorer, Collegeville, Pennsylvania

000024

a. The most effective adjuvants were the largest, most hydrophobic polymers, namely, triblocks Pluronic L-121 (2/4500) and L-101 (2/3800), and octablock T1501 (2/7500);
b. As the length of the POE chains was increased, the preparations lost their activity as immune system stimulants (adjuvants) and induced less inflammation;
c. A decrease in the molecular weight of the molecule, while maintaining a fixed proportion of POP and POE, decreased adjuvant activity but increased the toxicity, as indicated by inflammation at the site of injection.

2. Copolymers with the reverse structure (POP_a-POE_b-POP_c) were weak adjuvants, but tended to stimulate granulomatous inflammation and proliferation of fibroblasts.

The relationship between HLB and adjuvant activity was not a simple one. All of the strong adjuvants had low HLB values as had been seen in an earlier study [43], but several copolymers with low HLB values had no demonstrable adjuvant activity for BSA.

Several observations indicated that a highly specific mechanism was involved. Pluronic L-121 (2/4500) stimulated a mean antibody titer to BSA of 67,000, whereas Pluronic L-122 (4/5000), similarly injected, stimulated a titer of only 184. The Pluronic L-121 and L-122 differ only in the length of the POE chains. Again, Pluronic L-101 (2/3800) and 31R1 (2/3500) produced very different immunologic and inflammatory responses (antibody titers of 84,000 versus 264), even though composed of markedly similar components, but attached in the reverse order. Among the octablock copolymers, adjuvant activity increased as the inflammatory action decreased.

Hunter and Bennett suggested [25] that much of the activity of these agents derived from their ability to form adsorptive (adhesive) surfaces on oil drops which bind and activate complement, and a variety of other biologically active molecules in addition to the antigen. If this is true, the specificity of the various block copolymers is based on their physico-chemical properties rather than on any chemical interactions, a generality which seems borne out in evaluations of the activity of these copolymers in other biological systems discussed earlier.

Johnston and Miller [20] sought to relate structurally-dependent properties of copolymers to their toxicity for muscle tissue. Such information would indicate the potential utility of these copolymers for parenteral coadministration with drugs. Four triblock poloxamers—Pluronic F-88 (Poloxamer 238; 16/ 10800), F-127 (Poloxamer 407; 14/12500), P-105 (Poloxamer 335; 10/6500), and P-123 (Poloxamer 403; 6/5750)—were injected i.m. into rabbits in single and multiple (5 daily doses) injection studies. These copolymers vary in their respective POE and POP chain lengths, and therefore in HLB and molecular weight.

000025

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA ESTABILIZAR VIRUS VIVOS ATENUADOS

Prioridad

[0001] La presente solicitud reivindica el beneficio de la prioridad sobre la solicitud provisoria de patente de los Estados Unidos N.° 60/910.579, presentada en 6 de abril de 2007, que se incorpora a la presente en su totalidad.

Campo

[0002] Las formas de realización de la presente se refieren a composiciones y métodos para estabilizar virus vivos atenuados. Otras formas de realización se refieren a composiciones y métodos para reducir la degradación de virus vivos atenuados. Aún otras formas de realización se refieren a los usos de estas composiciones en kits para aplicaciones y métodos portátiles.

Antecedentes

[0003] Las vacunas para proteger contra infecciones virales se han usado efectivamente para reducir la incidencia de enfermedad humana. Una de las tecnologías más exitosas para las vacunas virales consiste en inmunizar animales o humanos con una cepa debilitada o atenuada del virus (un "virus vivo atenuado"). Debido a la limitada replicación después de la inmunización, la cepa atenuada no causa enfermedad. Sin embargo, la limitada replicación viral es suficiente para expresas la totalidad del repertorio de antígenos virales y generar respuestas inmunes poderosas y duraderas contra el virus. En consecuencia, luego de la posterior exposición a una cepa patogénica del virus, el individuo inmunizado está protegido contra la enfermedad.

Estas vacunas a virus vivos atenuados se encuentran entre las vacunas más exitosas de las usadas en la salud pública.

[0004] Diez de las dieciséis vacunas virales aprobadas para la venta en los Estados Unidos son a virus vivos atenuados. Las vacunas a virus vivos altamente exitosas incluyen las vacunas contra el virus 17D de fiebre amarilla, el virus de polio de Sabin tipos 1, 2 y 3, los virus de sarampión, paperas, rubéola, varicela y vacuna de virus. El uso de la vacuna contra el virus de vacuna para controlar brotes de viruela condujo a la primera y única erradicación de una enfermedad humana. La vacuna de virus de polio Sabin ha contribuido a prevenir la enfermedad discapacitante en todo el mundo y se utiliza en los esfuerzos tendientes a erradicar la polio. La vacunación infantil con vacunas contra sarampión, paperas, rubéola y varicela previene millones de muertes y enfermedades a nivel internacional.

[0005] Recientes avances técnicos tales como reorganización, genética inversa y adaptación al frío, han conducido al otorgamiento de licencias de virus vivos atenuados para gripe y rotavirus. Numerosas vacunas a virus vivos desarrolladas por tecnologías de ADN recombinante se encuentran en etapa de prueba clínica en humanos, incluso las vacunas para la enfermedad del Nilo Occidental, la fiebre de dengue, el paludismo, la tuberculosis y el HIV. Estas vacunas a virus recombinantes dependen de la manipulación de vacunas a virus atenuados bien definidas, tales como adenovirus, virus de vacuna, virus 17D de fiebre amarilla o virus dengue, DEN-2 PDK-53. Los virus atenuados seguros se obtienen por ingeniería genética con la finalidad de expresar antígenos protectores contra otros patógenos virales o bacterianos. Se han aprobado varias

vacunas a virus recombinantes para uso animal, incluso un virus recombinante de viruela de canario/leucemia felina, un virus recombinante de viruela de canario/trastorno canino, un virus recombinante de viruela de canario/Nilo Occidental y un virus recombinante de fiebre amarilla/Nilo Occidental. Como grupo, las vacunas a virus vivos atenuados se encuentran entre las intervenciones médicas más exitosas en la historia de la humanidad, sólo segundas al advenimiento de los antibióticos, y mantienen la promesa de mejorar la salud pública en todo el mundo.

[0006] Para que las vacunas a virus vivos atenuados sean efectivas, deben tener capacidad de replicación después de la inmunización. En consecuencia, cualquier factor que inactive el virus puede incapacitar la vacuna. Por ejemplo, la amplia distribución y el uso de la vacuna contra la viruela antes de la segunda guerra mundial eran limitadas, porque el virus se inactivaba después de sólo unos pocos días a temperatura ambiente. En la década de 1920, científicos franceses demostraron que la vacuna secada por congelamiento proveía estabilidad a largo plazo y se desarrollaron técnicas para la fabricación en gran escala de vacuna secada por congelamiento en la década de 1940 (ver por ejemplo Collier 1955). Además del secado por congelamiento, se han detectado varios aditivos que pueden contribuir a estabilizar los virus en las vacunas a virus vivos atenuados (ver por ejemplo Burke, Hsu et al 1999). Estos estabilizadores generalmente incluyen uno o más de los siguientes componentes: cationes divalentes, soluciones salinas buffer, quelantes, urea, azúcares (por ejemplo sacarosa, lactosa, trehalosa), polioles (por ejemplo, glicerol, manitol, sorbitol, polietilenglicol),

aminoácidos, hidrolizados de proteínas (por ejemplo hidrolizado de caseína, hidrolizado de lactalbúmina, peptona), proteínas (por ejemplo gelatina, albúmina sérica humana) o polímeros (por ejemplo dextrano).

[0007] Sin embargo, incluso con estos agentes estabilizadores, muchas de las vacunas comúnmente usadas aún requieren refrigeración para su estabilización. Otras vacunas comúnmente usadas son sensibles a temperaturas extremas; el calor excesivo o el congelamiento accidental pueden inactivar la vacuna. El mantenimiento de esta "cadena de frío" durante la distribución es particularmente difícil en los países en desarrollo. En consecuencia, se mantiene la necesidad de mejorar la estabilidad de las vacunas a virus vivos atenuados existentes y recién desarrolladas.

[0008] Los flavivirus se encuentran entre los virus más lábiles. Son virus con envoltura que tienen genoma ARN de aproximadamente 11.000 bases. La mayoría de los flavivirus son transmitidos por un vector artrópodo, comúnmente mosquitos. Existen más de 70 flavivirus diferentes que se agrupan en tres categorías principales sobre la base de su serología: el grupo dengue, el grupo de la encefalitis japonesa y el grupo de la fiebre amarilla. Entro los flavivirus conocidos, 40 son transmitidos por mosquitos, 16 son transmitidos por garrapatas y 18 virus no tienen insecto vector identificado. En consecuencia, la mayoría de los flavivirus han evolucionado hasta replicarse en su artrópodo vector y su especie huésped vertebrado (a menudo aves o mamíferos). La urbanización en expansión, los viajes por todo el mundo y cambios ambientales (tales como la deforestación o los patrones de lluvia) han conducido a la

emergencia de diversos flavivirus como amenazas a la salud pública humana. Dichos virus incluyen, sin limitaciones, virus de fiebre amarilla, virus dengue, virus del Nilo Occidental, virus de encefalitis japonesa, y virus de encefalitis transmitida por ácaros.

[0009] Mediante el control intensivo de mosquitos y los esfuerzos de vacunación, la fiebre amarilla fue eliminada de gran parte de América del Norte, Central y del Sur, el Caribe y Europa. Sin embargo, en los últimos 20 años ha aumentado la cantidad de países que informan casos. El virus de la fiebre amarilla ahora es endémico en importantes porciones de África y América del Sur y algunas islas del Caribe. La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que ocurren 200.000 casos anuales de fiebre amarilla que conducen a 30.000 muertes. Desde la segunda guerra mundial, el flavivirus de dengue se ha diseminado a las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo y ahora amenaza a más de 3,5 mil millones de personas, alrededor de la mitad de la población mundial. La OMS estima que ocurren 50-100 millones de casos de fiebre dengue al año. 500.000 de ellos pertenecen a la forma más severa de la enfermedad, que pone en peligro la vida, denominada fiebre dengue hemorrágica, que causa más de 25.000 muertes por año. Una forma particularmente virulenta de virus del Nilo Occidental fue introducida en el hemisferio occidental, presuntamente por viajeros, en Nueva York en 1999. El virus transmitido por mosquito infectó aves como huésped primario, pero también causó enfermedad y mortalidad en humanos y caballos. El virus del Nilo Occidental se difundió por los Estados Unidos, Canadá y México. Desde su introducción, el virus del Nilo Occidental

ha causado más de 20.000 casos informados de enfermedad del Nilo Occidental que causaron 950 muertes en los Estados Unidos. El virus de la encefalitis japonesa causa de 30.000 a 50.000 casos de enfermedad neurológica anualmente, principalmente en el este y el sur de Asia. El 25-30% de los casos informados son fatales. El virus de la encefalitis transmitida por ácaros es endémico en partes de Europa y Asia y continúa causando brotes episódicos que afectan a miles de individuos. Los virus relacionados que tienen diseminación geográfica más limitada incluyen el virus Kunjin (un pariente cercano del virus del Nilo Occidental) y el virus de la encefalitis del valle Murray en Australia y Nueva Guinea, el virus de encefalitis de San Luis en América del Norte y del Sur, los virus Usutu, Koutango y Yaonde en África, y el virus Cacipacore en América del Sur.

[00010] Se han desarrollado vacunas a virus vivos atenuados que son seguras y protectoras contra enfermedades por flavivirus, tales como fiebre amarilla y encefalitis japonesa. La vacuna a virus vivos atenuados 17D, ha sido ampliamente usada para prevenir la fiebre amarilla. Las actuales vacunas de flavivirus son liofilizadas en presencia de estabilizadores. No obstante, las vacunas requieren almacenamiento y despacho a 2 - 8 °C, un requisito que es difícil de cumplir en los países en desarrollo y las regiones más remotas de las naciones desarrolladas. Además, luego de la reconstitución, las vacunas pierden rápidamente potencia, incluso cuando se almacenan a 2 - 8 °C.

[00011] La vacuna contra sarampión es otro ejemplo de un virus lábil atenuado que se usa en todo el mundo para prevenir la enfermedad. El virus del sarampión en un virus

ARN de cadena negativa no segmentada con cubierta, de la familia Paramyxovirus. El sarampión es una enfermedad estacional altamente contagiosa que puede afectar virtualmente a cualquier niño antes de la pubertad en ausencia de vacunación. En países en vías de desarrollo, las tasas de mortalidad en niños infectados por sarampión pueden alcanzar hasta 2 a 15%. De hecho, a pesar de los esfuerzos tendientes a instituir la inmunización en todo el mundo, el sarampión aún causa más de 7.000 muertes de niños por año. La vacuna de sarampión es una vacuna a virus vivos atenuados que se fabrica en células primarias de fibroblastos de pollo. La vacuna se estabiliza con gelatina y sorbitol, y luego es liofilizada. La vacuna estabilizada y liofilizada tiene una vida de depósito de 2 años o más si se almacena de 2 a 8 °C. Sin embargo, la vacuna liofilizada aún requiere una cadena de frío que es difícil de mantener en los países en desarrollo. Además, luego de la reconstitución, la vacuna pierde el 50% de si potencia dentro de la hora siguiente a temperatura ambiente (20 a 25 °C).

[00012] En consecuencia, existe una necesidad en la técnica de mejorar las formulaciones de vacunas.

SÍNTESIS

[00013] Las formas de realización de la presente se refieren a métodos y composiciones para reducir o prevenir el deterioro o la inactivación de una composición de virus vivos atenuados. Ciertas composiciones descritas pueden incluir combinaciones de componentes que reducen el deterioro de un virus vivo atenuado. Otras formas de realización de la presente se refieren a combinaciones de excipientes que mejoran en gran medida la estabilidad de

los virus vivos atenuados. Aún otras composiciones y métodos de la presente están dirigidos a reducir la necesidad de menores temperaturas (por ejemplo almacenamiento refrigerado o congelado) a la vez que incrementa la vida de depósito de los virus vivos atenuados acuosos y/o reconstituidos.

[00014] De acuerdo con estas formas de realización, ciertos virus vivos atenuados están dirigidos a los flavivirus. Algunas formas de realización, dirigidas a composiciones, pueden incluir, sin limitaciones, uno o más virus vivos atenuados, tales como uno o más flavivirus vivo atenuado en combinación con uno o más agentes tensioactivos de alto peso molecular, proteínas, e hidratos de carbono.

[00015] Las composiciones contempladas en la presente pueden incrementar la estabilización y/o reducir la inactivación y/o la degradación de un virus vivo atenuado que incluyen, sin limitaciones, un virus vivo atenuado de Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Pestivirus, Picornavirus, Calicivirus, Reovirus, Parvovirus, Papovavirus, Adenovirus, Herpes virus, o Poxvirus.

[00016] Otras formas de realización se refieren a composiciones de virus vivos atenuados y métodos dirigidos a composiciones de vacuna capaces de reducir o prevenir el inicio de una condición médica causada por uno o más de los virus contemplados en la presente. De acuerdo con estas formas de realización, las condiciones médicas pueden incluir, sin limitaciones, infección del Nilo Occidental, fiebre dengue, encefalitis japonesa, enfermedad del bosque

de Kyasanur, encefalitis del valle Murray, fiebre hemorrágica de Alkhurma, encefalitis de San Luis, encefalitis transmitida por ácaros, fiebre amarilla y infección por virus de hepatitis C.

[00017] En ciertas formas de realización, las composiciones contempladas en la presente pueden estar parcialmente o totalmente deshidratadas o hidratadas. En otras formas de realización, los agentes proteicos contemplados en el uso de composiciones de la presente pueden incluir, sin limitaciones, lactalbúmina, albúmina sérica humana, una albúmina sérica humana recombinante (rHSA), albúmina sérica bovina (BSA), otras albúminas séricas o miembros de la familia de genes de albúmina. Los sacáridos o agentes polioles pueden incluir, sin limitaciones, monosacáridos, disacáridos, alcoholes azúcar, trehalosa, sacarosa, maltosa, isomaltosa, celibiosa, gentiobiosa, laminarribosa, xilobiosa, manobiosa, lactosa, fructosa, sorbitol, manitol, lactitol, xilitol, eritritol, rafinosa, amilasa, ciclodextrinas, quitosano o celulosa. En ciertas formas de realización, los agentes tensioactivos pueden incluir, sin limitaciones, un agente tensioactivo no iónico tal como alquilpoli(óxido de etileno), copolímeros de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) (copolímeros de bloque de EO-PO), poli(vinilpirrolidona), alquilpoliglucósidos (tales como monoestearato de sacarosa, laurildiglucósido o monolaureato de sorbitano, octilglucósido y decilmaltósido), alcoholes grasos (alcohol cetílico o alcohol oleílico), o cocamidas (cocamida MEA, cocamida DEA y cocamida TEA).

[00018] En otras formas de realización, los agentes tensioactivos pueden incluir, sin limitaciones, los

copolímeros de bloque copolímero poloxamero 407; Pluronic F127, poloxamero 188, Pluronic F68®, copolímero poloxamero 403; Pluronic P123®, u otros copolímeros de bloque EO-PO con más de 3.000-4.000 PM.

[00019] En algunas formas de realización, las composiciones de vacuna pueden incluir, sin limitaciones, uno o más agentes proteicos que sean albúmina sérica; uno o más agentes sacáridos que sean trehalosa; y uno o más agentes tensioactivos poliméricos que sean el copolímero de bloque EO-PO, copolímero poloxamero 407, Pluronic F127®.

[00020] Algunas formas de realización de la presente se refieren a composiciones de virus vivos atenuados parcialmente o totalmente deshidratadas. De acuerdo con estas formas de realización, una composición puede estar 20 % o más; 30% o más ; 40% o más; 50% o más; 60% o más; 70 % o más; 80% o más; o 90% o más deshidratada.

[00021] Otras formas de realización se refieren a métodos disminuir la inactivación de virus vivos atenuados que incluyen, sin limitaciones, la combinación de uno o más virus vivos atenuados con una composición capaz de reducir la inactivación de un virus vivo atenuado que incluye, sin limitaciones, uno o más agentes proteicos; uno o más sacáridos o agentes polioles; y uno o más agentes tensioactivos de alto peso molecular, en donde la composición disminuye la inactivación del virus vivo atenuado. De acuerdo con estas formas de realización, el virus vivo atenuado puede incluir, sin limitaciones, un Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Pestivirus, Picornavirus, Calicivirus, Reovirus, Parvovirus,

Papovavirus, Adenovirus, Herpes virus o un Poxvirus. Además, los métodos y las composiciones descritas en la presente pueden incluir métodos de secado por congelamiento u otros métodos de deshidratación para la combinación. De acuerdo con estos métodos y composiciones, los métodos y las composiciones disminuyen la inactivación del virus vivo atenuado secado por congelamiento o parcialmente o totalmente deshidratado. En otros métodos, las composiciones para disminuir la inactivación de un virus vivo atenuado pueden comprender una composición acuosa o pueden comprender una composición rehidratada después de la deshidratación. Las composiciones descritas en la presente tienen capacidad para incrementar la vida de depósito de un virus vivo atenuado acuoso o rehidratado.

[00022] En ciertas formas particulares de realización, un virus vivo atenuado que se usa en una composición de vacuna contemplada en la presente puede incluir, sin limitaciones, una más vacunas de flavivirus vivos atenuados, incluso sin limitaciones, el virus de fiebre amarilla atenuado (tal como 17D), el virus de encefalitis japonesa atenuado, (tal como SA 14-14-2), el virus de dengue atenuado (tal como DEN-2/PDK-53 o DEN-4Δ30) o flavivirus quiméricos recombinantes.

[00023] En ciertas formas de realización, las composiciones contempladas en la presente tienen capacidad para disminuir la inactivación y/o la degradación de un virus vivo atenuado hidratado durante más de 24 horas a temperatura ambiente (por ejemplo aproximadamente 20 °C a aproximadamente 25 °C) o temperaturas de refrigeración (por ejemplo aproximadamente 0 °C a aproximadamente 10 °C). En

formas más particulares de realización, una composición de combinación tiene capacidad para mantener aproximadamente 100 por ciento del virus vivo atenuado durante más de 24 horas. Además, las composiciones de combinación contempladas en la presente tienen capacidad para de reducir la inactivación de un virus vivo atenuado hidratado durante al menos 2 ciclos de congelamiento y descongelamiento. Otros métodos se refieren a composiciones de combinación capaces de reducir la inactivación de un virus vivo atenuado hidratado durante aproximadamente 24 horas hasta aproximadamente 50 días a temperaturas de refrigeración (por ejemplo aproximadamente 0 °C a aproximadamente 10 °C). Las composiciones contempladas en estos métodos pueden incluir, sin limitaciones, uno o más agentes proteicos de albúmina sérica; uno o más agentes sacáridos de trehalosa; y uno o más agentes de copolímeros de bloque EO-PO de copolímero poloxamero 407, Pluronic F127. En ciertas formas de realización, la composición del virus vivo atenuado se mantiene a aproximadamente 100% de título viral después de 7 días a aproximadamente 21 °C y aproximadamente 100% de título viral después de 50 días a temperaturas de refrigeración de alrededor de 4 °C. Otras formas de realización en la presente pueden incluir composiciones de virus vivo atenuados que se mantienen con aproximadamente 90%, o aproximadamente 80% del título viral después de 7 días a aproximadamente 21 °C y aproximadamente 90%, o aproximadamente 80% de título viral después de 50 días a temperaturas de refrigeración de aproximadamente 4 °C. Otras formas de realización contempladas incluyen composiciones de virus vivos atenuados que mantienen en aproximadamente 3x a aproximadamente 10x la concentración de título viral después de varias horas (por ejemplo 20

horas) a aproximadamente 37 °C comparado con otras composiciones conocidas en la técnica (ver por ejemplo, las Fig. 4 y 5). Las composiciones descritas en la presente reducen la degradación del virus vivo atenuado cuando la composición se almacena a aproximadamente 37 °C.

[00024] Otras formas de realización se refieren a kits para reducir la inactivación de una composición de virus vivo atenuado que incluye, sin limitaciones, un contenedor; y una composición que incluye, sin limitaciones, uno o más agentes proteicos, uno o más agentes sacáridos o polioles, y uno o más agentes de copolímeros de bloque EO-PO, en donde la composición disminuye la inactivación y/o la degradación de un virus vivo atenuado. De acuerdo con estas formas de realización, un kit de composición puede incluir uno o más agentes proteicos de albúmina sérica; uno o más agentes de sacárido de trehalosa; y uno o más agentes de copolímeros de bloque EO-PO. Además, en la presente se contempla un kit que también puede incluir uno o más virus vivos atenuados que incluyen, sin limitaciones, un Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Pestivirus, Picornavirus, Calicivirus, Reovirus, Parvovirus, Papovavirus, Adenovirus, Herpes virus, o Poxvirus. En ciertas formas de realización, las composiciones de la presente pueden incluir trehalosa como agente sacárido. De acuerdo con estas formas de realización, la concentración de trehalosa puede ser igual o mayor de 5% (p/v). En ciertas formas de realización, las composiciones de la presente pueden incluir polímero F127 como agente de copolímeros de bloque EO-PO. De acuerdo con estas formas de realización, la concentración de copolímero

poloxamero 407, pluronic F127® puede ser de aproximadamente 0,1 a aproximadamente 4 por ciento (p/v).

[00025] En otras formas de realización, las composiciones contempladas en la presente pueden contener cantidades de trazas o no contener cationes divalentes. Por ejemplo, las composiciones contempladas en la presente pueden tener cantidades de trazas o nada de calcio/magnesio (Ca^{+2}/Mg^{+2}).

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y se incluyen para demostrar mejor ciertos aspectos de formas particulares de realización de la presente. Las formas de realización se pueden entender mejor por referencia a una o más de estas figuras en combinación con la descripción detallada presentada en la presente.

[00026] La **Fig. 1** representa un ejemplo de histograma de los experimentos que utilizan diversas composiciones para analizar la estabilidad de un ejemplo de virus, flavivirus DEN-2 PDK 53, en las composiciones.

[00027] La **Fig. 2** representa un ejemplo de gráfico de un análisis cinético de un ejemplo de virus, flavivirus DEN-2 PDK 53, para la inactivación viral a 37 °C en diversos ejemplos de composiciones.

[00028] La **Fig. 3** representa un ejemplo de histograma de un análisis de un ejemplo de virus, el virus DEN-2 PDK 53, almacenado a 37 °C durante 21 horas. Los valores se expresan como porcentaje del título viral remanente después de la incubación respecto del título inicial. Los

porcentajes de la formulación se refieren (p/v) al excipiente respectivo.

[00029] La **Fig. 4** representa un ejemplo de histograma de un análisis de un ejemplo de virus, el virus DEN-2 PDK 53, almacenado a 37 °C durante 23 horas en diferentes composiciones. Los valores se expresan como porcentaje del título viral remanente después de la incubación respecto del título inicial.

[00030] La **Fig. 5** representa un ejemplo de histograma de un análisis de un ejemplo de virus, el virus DEN-2 PDK 53, almacenado a 37 °C durante 23 horas en diferentes composiciones. Los valores se expresan como porcentaje del título viral remanente después de la incubación respecto del título inicial. Las dos barras para cada formulación representan duplicados del experimento.

[00031] La **Fig. 6** representa un ejemplo de histograma de un análisis de un ejemplo de virus, el virus DEN-2 PDK 53, después de dos ciclos de congelamiento y descongelamiento cuando se almacena en diferentes formulaciones. Los valores se expresan como porcentaje del título viral remanente después de los ciclos de congelamiento y descongelamiento respecto del título inicial.

[00032] La **Fig. 7** representa un ejemplo de gráfico de un análisis cinético de un ejemplo de virus, el flavivirus recombinante DEN-2 PDK 53/WN, en diferentes ejemplos de composiciones para la inactivación viral a 25 °C durante varias semanas.

[00033] La **Fig. 8** representa un ejemplo de gráfico de un análisis cinético de un ejemplo de virus, el flavivirus

recombinante DEN-2 PDK 53/WN, en diferentes ejemplos de composiciones para la inactivación viral a 4 °C durante varias semanas.

[00034] La **Fig. 9** representa un ejemplo de histograma de un análisis de un ejemplo de virus, el virus DEN-2 PDK-53, después de liofilización en diferentes ejemplos de composiciones. La inactivación viral se evaluó tal como se describió con anterioridad después de dos semanas a diferentes temperaturas.

DESCRIPCIÓN DE FORMAS DE REALIZACIÓN ILUSTRATIVAS

Definiciones

[00035] Tal como se usa en la presente, "un" o "una" pueden significar uno o más de un elemento.

[00036] Tal como se usa en la presente, "aproximadamente" puede significar hasta e y incluso más o menos el cinco por ciento, por ejemplo, aproximadamente 100 puede significar 95 y hasta 105.

[00037] Tal como se usa en la presente, agentes "sacáridos" puede significar uno o más monosacáridos, (por ejemplo glucosa, galactosa, ribosa, manosa, ramnosa, talosa, xilosa o alosarabinosa), uno o más disacáridos (por ejemplo trehalosa, sacarosa, maltosa, isomaltosa, celibiosa, gentiobiosa, laminarribosa, xilobiosa, manobiosa, lactosa o fructosa), trisacáridos (por ejemplo acarbosa, rafinosa, melizitosa, panosa o celotriosa) o polímeros de azúcar (por ejemplo dextrano, xantano, pululano, ciclodextrinas, amilosa, amilopectina, almidón,

celooligosacáridos, celulosa, maltooligosacáridos, glucógeno, quitosano o quitina).

[00038] Tal como se usa en la presente, agentes "polioles" puede significar cualquier alcohol azúcar (por ejemplo manitol, sorbitol, arabitol, erutritol, maltitol, xilitol, glicitol, glicol, poliglicitol, polietilenglicol, polipropilenglicol, o glicerol).Tal como se usa en la presente, "agentes tensioactivos de alto peso molecular" puede significar una molécula tensioactiva anfifílica con peso molecular superior a 1500.

[00039] Tal como se usa en la presente, "copolímero de bloque EO-PO" puede significar un copolímero que consiste de bloques de poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno). Además, tal como se usa en la presente, "Pluronic" puede significar copolímeros de bloque EO-PO en EOx-POy-EOx. Esta configuración de copolímeros de bloque EO-PO también se refiere como "Poloxámero" o "Synperonic".

[00040] Tal como se usa en la presente, "virus atenuado" puede significar un virus del que ha demostrado signos clínicos reducidos o ausentes de enfermedad cuando se administra a un animal.

DESCRIPCIONES DETALLADAS

[00041] En las siguientes secciones, se describen diversos ejemplos de composiciones y métodos a fin de detallar diversas formas de realización. Será obvio para un experto en la técnica que la puesta en práctica de las diversas formas de realización no requiere emplear la totalidad o incluso algunos de los detalles reseñados en la presente, sino más bien que las concentraciones, los

tiempos y otros detalles específicos se pueden modificar mediante experimentación de rutina. En algunos casos, no se han incluido métodos o componentes conocidos en la descripción.

[00042] La estabilidad de las vacunas de flavivirus ha sido evaluada para los virus vivos atenuados existentes de fiebre amarilla y virus de encefalitis japonesa. Cuando se analizaron en 1987, sólo cinco de las doce vacunas de fiebre amarilla fabricadas en ese momento cumplían con los estándares mínimos de estabilidad. Luego se demostró que la adición de una mezcla de azúcares, aminoácidos y cationes divalentes estabilizaba la vacuna liofilizada, por lo que la vacuna perdía menos de 1 log de potencia después de la incubación a 37 °C durante 14 días. Se han descrito formulaciones liofilizadas estabilizantes para la vacuna de fiebre amarilla (ver por ejemplo la patente de los Estados Unidos N.° 4.500.512). La patente de los Estados Unidos N.° 4.500.512, describe una combinación de lactosa, sorbitol, los cationes divalentes calcio y magnesio, y al menos un aminoácido. Si bien esta formulación puede contribuir a estabilizar la vacuna liofilizada, no provee estabilidad a la vacuna en forma acuosa. Otro estudio examinó la capacidad de varias formulaciones diferentes que incluyen las composiciones descritas con anterioridad y el efecto de la sacarosa, trehalosa y lactalbúmina sobre la estabilidad de la vacuna liofilizada de fiebre amarilla. Se halló que las formulaciones que consisten de 10 % de sacarosa sola, 2% de sorbitol con 4% de inositol, o 10% de sacarosa con 5% de lactalbúmina, 0,1 g/l de $CaCl_2$ y 0,076 g/l de $MgSO_4$ proveen la mejor estabilidad (ver por ejemplo Adebayo, Sim-Brandenburg et al. 1998). Sin embargo, en todos los casos

000043

después de la resuspensión, la vacuna de fiebre amarilla continúa siento muy inestable y se debe descartar después de sólo aproximadamente una hora (ver por ejemplo Monath 1996; Adebayo, Sim-Brandenburg et al. 1998). Esto causa desperdicio de la vacuna y la posibilidad de que se administre vacuna ineficaz en condiciones de campo, si se usa la vacuna inestable.

[00043] Otra vacuna de flavivirus vivos atenuados para la protección contra encefalitis japonesa ha obtenido licencia y tiene amplio uso en China (ver por ejemplo Halstead y Tsai 2004). La cepa de la vacuna de encefalitis japonesa SA 14-14-2 se cultiva en células primarias de riñón de hámster y el sobrenadante celular se cosecha y se filtra en grueso. Una composición previa incluía 1% de gelatina y 5% de sorbitol añadido como estabilizantes. Mediante el uso de dichos estabilizantes, la vacuna es liofilizada y luego es estable a 2 a 8 °C durante al menos 1,5 años, pero sólo 4 meses a temperatura ambiente y 10 días a 37 °C. Al igual que con la vacuna de fiebre amarilla, la vacuna reconstituida es muy lábil y es estable durante sólo 2 horas a temperatura ambiente (ver por ejemplo Wanf, Yang et al 1990). En ciertas formas de realización de la presente, se contemplan las composiciones de virus de flavivirus vivos atenuados para estabilizar o reducir la degradación de la vacuna de encefalitis japonesa.

[00044] No se ha identificado una formulación para una vacuna de flavivirus vivos atenuados que provea estabilidad a largo plazo de las formulaciones liofilizadas a temperaturas superiores a 2 - 8 °C. Además, no se ha descrito ninguna formulación que impida la pérdida de

título, que estabilice o que reduzca la degradación de vacunas acuosas durante más de unas pocas horas.

[00045] También se han descrito formulaciones para otros virus vivos atenuados (ver por ejemplo Burke, Hsu et al. 1999). Un estabilizador común, referido como SPGA es una mezcla de 2 a 10% de sacarosa, fosfato, glutamato de potasio y 0,5 a 2% de albúmina sérica (ver por ejemplo Bovarnick, Miller et al. 1950). Se han identificado diversas modificaciones de esta formulación básica con diferentes cationes, con sustituciones de almidón hidrolizado o dextrano por sacarosa, y con sustituciones de hidrolizado de caseína o polivinilpirrolidona por albúmina sérica. Otras formulaciones usan hidrolizado de gelatina en lugar de albúmina sérica como fuente de proteínas (Burke, Hsu et al 1999). Sin embargo, la gelatina puede causar reacciones alérgicas en niños inmunizados y puede ser causa de eventos adversos relacionados con la vacuna. La patente de los Estados Unidos N.° 6.210.683 describe la sustitución de albúmina sérica humana recombinante por albúmina purificada de suero humano en formulaciones de vacuna.

[00046] Las formas de realización de la presente describen composiciones que mejoran la estabilidad y/o reducen en deterioro de las vacunas de virus vivo atenuado comparadas con las de la técnica previa. Ciertas composiciones descritas en la presente proveen estabilidad de los virus acuosos hasta 2 horas; hasta 3 horas; hasta 4 horas y más de 4 horas a aproximadamente 37 °C. Ciertas composiciones descritas en la presente proveen estabilidad de los virus acuosos hasta de hasta 1 día a aproximadamente 1 semana o más, a aproximadamente temperatura ambiente (por ejemplo 25 °C). Las formas de realización contempladas en

000345

la presente proveen aumento de la protección de un virus vivo atenuado por ejemplo contra el congelamiento y/o descongelamiento, y/o temperaturas elevadas. En ciertas formas de realización, las composiciones en la presente pueden estabilizar, reducir el deterioro y/o prevenir la inactivación de los productos a virus vivos atenuados deshidratados en condiciones de temperatura ambiente (por ejemplo de aproximadamente 25 °C). En otras formas de realización, las composiciones contempladas en la presente pueden estabilizar, reducir el deterioro y/o prevenir la inactivación de productos a virus vivos atenuados acuosos a aproximadamente 25 °C o hasta aproximadamente 37 °C. Las composiciones y los métodos descritos en la presente pueden facilitar el almacenamiento, la distribución, la entrega y la administración de vacunas virales en regiones desarrolladas y en vías de desarrollo.

[00047] Otras formas de realización pueden incluir composiciones para vacunas a virus vivos atenuados que incluyen, sin limitaciones, Picornavirus (por ejemplo, poliovirus, virus de enfermedad de pie y boca), Calicivirus (por ejemplo, virus SARS y virus de peritonitis infecciosa felina), Togavirus (por ejemplo, virus sindbis, el virus de encefalitis equina, virus chikungunya, virus de rubéola, virus de río Ross, virus de diarrea bovina, virus de cólera de jabalí), Flavivirus (por ejemplo, virus de dengue, virus del Nilo Occidental, virus de fiebre amarilla, virus de encefalitis japonesa, virus de encefalitis de San Luis, virus de encefalitis transmitida por ácaros), Coronavirus (por ejemplo, coronavirus humano (resfrío común), virus de gastroenteritis de cerdo), Rhabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia, virus de estomatitis vesicular), Filovirus

000046

(por ejemplo, virus Marburg, virus Ebola), Paramyxovirus (por ejemplo, virus de sarampión, virus de trasntornos caninos, virus de paperas, virus de parainfluenza, virus sincicial respiratorio, virus de enfermedad de Newcastle, virus de peste), Orthomyxovirus (por ejemplo, virus de gripe humana, virus de gripe aviar, virus de gripe equina), Bunyavirus (por ejemplo, hantavirus, virus LaCrosse, virus de fiebre del valle del Rift), Arenavirus (por ejemplo, virus Lassa, virus Machupo), Reovirus (por ejemplo, reovirus humano, rotavirus humano), Birnavirus (por ejemplo, virus infeccioso de la bursa, virus de necrosis pancreática de peces), Retrovirus (por ejemplo, HIV 1, HIV 2, HTLV-1, HTLV-2, virus de leucemia bovina, virus de inmunodeficiencia felina, virus de sarcoma felino, virus de tumor mamario murino), Hepadnavirus (por ejemplo, virus de hepatitis B), Parvovirus (por ejemplo, parvovirus humano B, parvovirus canino, virus de panleucopenia felino) Papovavirus (por ejemplo, papilomavirus humano, SV40, papilomavirus bovino), Adenovirus (por ejemplo, adenovirus humano, adenovirus canino, adenovirus bovino, adenovirus porcino), Herpes virus (por ejemplo, virus herpes simplex, virus varicella-zoster, adenovirus de rinotraqueítis infecciosa bovina, citomegalovirus humano, herpesvirus 6 humano), y Poxvirus (por ejemplo, vacuna, virus de eruptiva aviaria, virus de eruptiva de mofeta, virus de eruptiva de erizo, virus de eruptiva de mono, virus de eruptiva de vaca, virus de molusco contagioso).

[00048] Los expertos en la técnica reconocerán que las composiciones o las fórmulas de la presente se refieren a virus que son atenuados por cualquier medio, incluso sin limitaciones, pasaje por cultivos celulares,

reorganización, incorporación de mutaciones en clones infecciosos, genética inversa, otras manipulaciones de ADN o ARN recombinante. Además, los expertos en la técnica reconocerán que otras formas de realización se refieren a virus que han sido obtenidos por ingeniería con la finalidad de expresar cualquier otra proteína o ARN incluso, sin limitaciones, flavivirus recombinante, adenovirus recombinante, poxvirus recombinante, retrovirus recombinante, virus recombinante adenoasociado y herpes virus recombinante. Dichos virus se pueden usar como vacunas para enfermedades infecciosas, vacunas para tratar condiciones oncológicas, o virus para introducir proteínas expresas o ARN (por ejemplo, terapia génica, terapia antisentido, terapia con ribozimas o terapia con pequeños ARN inhibitorios) con el fin de tratar trastornos.

[00049] En algunas formas de realización, las composiciones en la presente pueden contener uno o más virus con cubiertas de membrana (por ejemplo, virus con cubierta) de las familias Togavirus, Flavivirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Herpesvirus o Poxvirus. En ciertas formas de realización, las composiciones contienen uno o más virus ARN con cubierta de las familias Togavirus, Flavivirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus o Retrovirus. En otras formas de realización, las composiciones en la presente pueden contener uno o más virus ARN con cubierta de ARN de cadena positiva de las familias Togavirus, Flavivirus, Coronavirus o Retrovirus. En ciertas formas de realización, las composiciones pueden contener uno o más

000048

flavivirus vivos atenuados (por ejemplo, virus dengue, virus del Nilo Occidental, virus de fiebre amarilla o virus de encefalitis japonesa).

[00050] Algunas formas de realización en la presente se refieren a composiciones para virus vivos atenuados en forma acuosa o liofilizada. Los expertos en la técnica reconocerán que las formulaciones que mejoran la estabilidad térmica terapia y previenen la inactivación por congelamiento-descongelamiento mejorarán los productos que son líquidos, en polvo, secados por congelamiento o liofilizados y preparados por los métodos conocidos en la técnica. Después de la reconstitución, dichas vacunas estabilizadas se pueden administrar por diversas vías, incluso, sin limitaciones administración intradérmica, administración subcutánea, administración intramuscular, administración intranasal, administración pulmonar o administración oral. Diversos dispositivos son conocidos en la técnica para la provisión de la vacuna, incluso, sin limitaciones, jeringa y aguja para inyección, administración por aguja bifurcada, administración por parches intradérmicos o bombas, suministro por inyección sin aguja, suministro por partículas intradérmicas, suministro por polvo en aerosol.

[00051] Las formas de realización pueden incluir composiciones que consisten de uno o más virus vivos atenuados (tal como se describió con anterioridad) y una mezcla de uno o más agentes tensioactivos de alto peso molecular y una o más proteínas en un buffer fisiológicamente aceptable. En ciertas formas de realización, las composiciones incluyen, sin limitaciones uno o más virus vivos atenuados, uno o más agentes

tensioactivos de alto peso molecular, una o más proteínas, y uno o más hidratos de carbono, en un buffer fisiológicamente aceptable.

[00052] En otras formas de realización, las composiciones pueden contener uno o más agentes tensioactivos de alto peso molecular que incrementan la estabilidad térmica de los virus vivos atenuados. Se han incorporado agentes tensioactivos a las formulaciones de vacuna a fin de impedir la pérdida de material en superficies tales como viales de vidrio (ver por ejemplo Burke, Hsu et al. 1999). Sin embargo, ciertas formas de realización en la presente incluyen agentes tensioactivos de alto peso molecular con algunas propiedades bioquímicas inusuales de utilidad para las composiciones y los métodos descritos en la presente. Los polímeros de bloque EO-PO pueden incluir bloques de óxido de polietileno ($-CH_2CH_2O-$ designado EO) y óxido de polipropileno ($-CH_2CHCH_3O-$ designado PO). El bloque de PO puede estar flanqueado por dos bloques de EO en una disposición $EO_x-PO_y-EO_x$. Dado que el componente PO es hidrofílico y el componente EO es hidrofóbico, la hidroficidad global, el peso molecular y las propiedades tensioactivas se pueden ajustar mediante la variación de x e y en la estructura de bloque de $EO_x-PO_y-EO_x$. En las soluciones acuosas, los copolímeros de bloque EO-PO se autoensamblan en micelas con un núcleo de PO y una corona de grupos EO hidrofílicos. Se han investigado formulaciones de copolímeros de bloque EO-PO como potenciales agentes de suministro de fármacos para diversos fármacos hidrofóbicos y para proteínas, ADN o vacunas inactivadas (por ejemplo Todd, Lee et al. 1998; Kabanov, Lemieux et al. 2002). En altas concentraciones (por ejemplo: > que 10%) algunos de

los copolímeros de bloque EO-PO de mayor peso molecular sufrirán gelación inversa, con formación de un gel a medida que aumenta la temperatura. La formación de gel a temperatura corporal permite el uso de los geles de polímeros de bloque EO-PO que actúan en aplicaciones de depósito de fármaco y suministro de vacuna (ver por ejemplo Coeshott, Smithson et al. 2004). Además, debido a sus propiedades tensioactivas, estos polímeros se han usado en formulaciones coadyuvantes, y como emulsionantes en cremas y geles de aplicación tópica. Los copolímeros de bloque EO-PO también han demostrado acelerar la cicatrización de heridas y quemaduras y sellar membranas celulares después de daños mediados por radiación o electroporación.

[00053] En otras formas de realización, las composiciones de vacuna pueden incluir uno o más agentes tensioactivos con peso molecular de 1500 o mayor. En cierta forma de realización, el agente tensioactivo es un copolímero de bloque no iónico, hidrofílico de polioxietileno-polioxipropileno (o copolímero de bloque EO-PO). Si bien se han usado copolímeros de bloque EO-PO como coadyuvantes y vehículos de suministro para vacunas inactivadas, vacunas de proteínas o vacunas ADN, su uso para prevenir la inactivación de virus vivos no se ha anticipado en la técnica. En una particular forma de realización, una formulación puede contener uno o más polímeros EO-PO con un peso molecular de 3.000 o superior. En otras formas de realización, las composiciones pueden incluir en parte un copolímero de bloque EO-PO poloxamero 407, Pluronic F127® o copolímero poloxamero 403, Pluronic P123. Los expertos en la técnica reconocerán que se pueden hacer modificaciones químicas de los agentes tensioactivos. Está contemplado en

la presente considerar cualquier polímero tensioactivo esencialmente equivalente.

[00054] Las formas de realización de la presente pueden incluir composiciones de uno o más virus vivos atenuados, uno o más agentes tensioactivos y una o más proteínas. En ciertas formas de realización, una proteína puede ser una albúmina. La albúmina sérica es una de las proteínas más comunes en la sangre de los vertebrados y tiene múltiples funciones. La proteína tiene 585 aminoácidos con un peso molecular de 66500. La albúmina sérica humana no está glucosilada y tiene un único grupo tiol libre implicado en algunas de sus múltiples actividades fijadoras. La albúmina sérica muestra predominio de hélice α con tres dominios estructurales, cada uno subdividido en dos subdominios. La albúmina es conocida por fijar específicamente una variedad de moléculas, incluso fármacos tales como aspirina, ibuprofeno, halotano, propofol y warfarina así como ácidos grasos, aminoácidos, esteroides, glutatión, metales, bilirrubina, lisolecitina, hematina y prostaglandinas. Los diferentes dominios estructurales están implicados en la fijación de fármacos; la mayoría de los fármacos de moléculas pequeñas y hormonas se fijan a uno de los dos sitios primarios ubicados en los subdominios IIA y IIIA. Debido a su ausencia de inmunogenicidad, la albúmina es usada comúnmente como proteína portadora en productos biológicos. Dado que la dosis de proteína contenida en una vacuna a virus vivos atenuados puede ser de fracciones de un microgramo (derivado de 10^3 a 10^5 partículas virales), se usa una proteína portadora inerte para prevenir la pérdida por absorción y fijación inespecífica a vidrio, plástico u otras superficies. Sin embargo, tal como se

demostró en la presente, se observó un inesperado mejoramiento de la estabilidad con la combinación de una albúmina y copolímeros de bloque EO-PO, lo cual sugiere interacciones entre los dos componentes y/o entre los componentes y las partículas virales. Además, el aumento de la estabilización de virus en presencia de albúmina no es probable debido a que funciona como proteína portadora en general: otras proteínas tales como gelatina y lactoferrina no mejoran la estabilidad del virus.

[00055] En ciertas formas de realización, la albúmina sérica puede provenir de una fuente humana o de otro mamífero. Para las vacunas para uso pretendido humano, las formas particulares de realización pueden incluir albúmina humana u otros productos humanos según necesidad a fin de reducir o eliminare respuestas inmunes adversas. Los expertos en la técnica reconocerán que las albúminas específicas para cada especie se pueden usar en vacunas animales (por ejemplo albúmina canina para productos caninos, albúmina bovina para productos bovinos). En otras formas de realización, la proteína es una albúmina humana recombinante. Existen métodos estándar para expresar la albúmina humana recombinante o sus porciones en diversos sistemas de expresión que incluyen bacterias, levaduras, algas, plantas, células de mamífero o sistemas de animales transgénicos. Además, se puede producir albúmina sérica o sus porciones en sistemas sin células o por síntesis química. La albúmina humana recombinante producida en este y otros sistemas similares se incorpora en la presente. Los expertos en la técnica reconocerán que se puede sustituir con otras proteínas la albúmina. Por ejemplo, la albúmina es un miembro de una familia de genes múltiples. Debido a

sus similitudes estructurales y de secuencia, otros miembros de la familia (por ejemplo α-fetoproteína, proteína fijadora de vitamina D o afamina) pueden sustituir la albúmina en las composiciones y los métodos contemplados en la presente. Los expertos en la técnica también reconocerán que se pueden hacer modificaciones a la albúmina por cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo, por tecnología de ADN recombinante, por modificación posterior a la traducción, por escisión proteolítica y/o por medios químicos. Dichas sustituciones y alteraciones de la albúmina que proporcionan una función estabilizante esencialmente equivalente a la de la albúmina sérica sin sustituciones y alteraciones están contempladas en la presente.

[00056] En ciertas formas de realización, se describen las composiciones que tienen agentes tensioactivos de alto peso molecular, una proteína y un hidrato de carbono en un buffer farmacéuticamente aceptable. En algunas formas de realización, el hidrato de carbono es un azúcar o un poliol. Los azúcares pueden incluir, sin limitaciones, monosacáridos, (por ejemplo glucosa, galactosa, ribosa, manosa, ramnosa, talosa, xilosa o alosaarabinosa), disacáridos (por ejemplo trehalosa, sacarosa, maltosa, isomaltosa, celibiosa, gentiobiosa, laminaribosa, xilobiosa, manobiosa, lactosa, o fructosa), trisacáridos (por ejemplo acarbosa, rafinosa, melizitosa, panosa o celotriosa) o polímeros de azúcar (por ejemplo dextrano, xantano, pululano, ciclodextrinas, amilosa, amilopectina, almidón, celooligosacáridos, celulosa, maltooligosacáridos, glucógeno, quitosano, o quitina). Los polioles pueden incluir, sin limitaciones, manitol, sorbitol, arabitol,

eritritol, maltitol, xilitol, glicitol, glicol, poliglicitol, polietilenglicol, polipropilenglicol y glicerol.

[00057] En una particular forma de realización, las formulaciones pueden contener una combinación de uno o más copolímeros de bloque EO-PO, una o más proteínas, y trehalosa en un buffer farmacológicamente aceptable. En ciertas formas de realización, puede estar presente trehalosa en concentraciones que varían desde 5 hasta 50% (p/v). Se ha usado la trehalosa para mejorar la estabilidad de las formulaciones proteicas. Es ampliamente conocido en la técnica como crioconservante y es usado en la naturaleza para proteger los organismos contra el estrés. Los organismos anhidrobióticos capaces de tolerar condiciones de bajo contenido de agua contienen grandes cantidades de trehalosa. Se ha demostrado que la trehalosa previene eventos de fusión de membrana y transiciones de fase capaces de causar desestabilización de la membrana durante el secado. El análisis estructural sugiere que la trehalosa se ajusta bien entre los grupos de las cabezas polares de las bicapas lipídicas. La trehalosa también previene la desnaturalización de proteínas hábiles durante el secado. Se cree que la trehalosa estabiliza las proteínas por formación de puentes hidrógeno con residuos proteicos polares. La trehalosa es un disacárido que consiste de dos moléculas de glucosa en una unión 1:1. Debido a la unión 1:1, la trehalosa tiene escaso o nulo poder reductor y en consecuencia es esencialmente no reactivo con aminoácidos y proteínas. Esta falta de actividad reductora puede mejorar el efecto estabilizante de la trehalosa sobre las proteínas. En ciertas formas de realización, la trehalosa

provee estabilidad a los virus vivos atenuados. Esta actividad de la trehalosa puede deberse a su capacidad para estabilizar las membranas y las proteínas de cubierta del virus.

[00058] En otras formas de realización, las composiciones pueden incluir uno o más copolímeros de bloque EO-PO, una o más proteínas y uno o más hidratos de carbono, en donde uno de los hidratos de carbono es quitosano, en un buffer fisiológicamente aceptable para proveer mayor estabilidad a los virus vivos atenuados. En ciertas formas de realización, las composiciones pueden incluir quitosano en concentraciones que varían desde 0,001 hasta 2% (por ejemplo a un pH de aproximadamente 6,8). El quitosano es un polisacárido catiónico derivado por desacetilación de quitina, el polímero estructural de los exoesqueletos de los crustáceos. Es un polímero de N-acetilglucosamina y glucosamina; el contenido de los dos hidratos de carbono depende del grado de desacetilación. La carga positiva del quitosano permite que se fije a superficies y moléculas con carga negativa. En consecuencia se fija a superficies mucosas y se cree que promueve la absorción mucosa. El quitosano también se puede fijar y formar nanopartículas con ADN, ARN y otros oligonucleótidos y se ha usado en el suministro de genes no virales. Ciertas formas de realización de la presente demuestran que el quitosano incrementa la estabilidad de los virus vivos atenuados.

[00059] En ciertas formas de realización, se pueden describir composiciones que generalmente incluyen un buffer fisiológicamente aceptable. Los expertos en la técnica reconocen que existe una variedad de buffer fisiológicamente aceptables, incluso, sin limitaciones

buffers que contienen fosfato, TRIS, MOPS, HEPES, bicarbonato, otros buffer conocidos en la técnica y combinaciones de buffer. Además, los expertos en la técnica reconocen que el ajuste de las concentraciones salinas a niveles casi fisiológicos (por ejemplo, solución fisiológica o 0,15 M de sal total) puede ser óptimo para la administración parenteral de composiciones a fin de prevenir el daño celular y/o el dolor en el sitio de la inyección. Los expertos en la técnica también reconocerán que a medida que aumentan las concentraciones de hidratos de carbono, se puede disminuir las concentraciones de sales a fin de mantener la osmolaridad equivalente de la formulación. En ciertas formas de realización, se contempla un medio buffer con pH superior a 6,8; algunos virus vivos atenuados (por ejemplo flavivirus) son inestables a bajo pH. En otra forma de realización, el buffer fisiológicamente aceptable puede ser solución fisiológica con buffer fosfato (PBS).

[00060] Algunas composiciones de vacuna a virus vivos atenuados de la presente se refieren a composiciones que incrementan la estabilidad y/o reducen el deterioro de los virus vivos atenuados además de tener reducida inmunogenicidad o de ser no inmunogénicos. De acuerdo con estas formas de realización, las composiciones pueden incluir uno o más agentes proteicos; uno o más agentes sacáridos o polioles; y uno o más agentes tensioactivos de alto peso molecular, en donde la composición disminuye la inactivación del virus vivo atenuado. En consecuencia, ciertas composiciones contempladas en la presente tienen reducida reacción adversa cuando se administran a un sujeto. En algunos ejemplos de composiciones, los agentes

tensioactivos consisten de uno o más copolímeros de bloque EO-PO; los agentes proteicos se seleccionan del grupo que consiste de lactalbúmina, albúmina sérica, α-fetoproteína, proteína fijadora de vitamina D, afamina derivada de especies de vertebrados; y los agentes hidratos de carbono son uno o más de un sacárido y/o un poliol. En ciertas formas de realización, las composiciones pueden incluir uno o más de los agentes hidratos de carbono seleccionados del grupo que consiste de trehalosa, sacarosa, quitosano, sorbitol y manitol. En ciertas formas más particulares de realización, a fin de reducir la reacción inmune contra la vacuna, la albúmina sérica se puede derivar de una especie de vertebrado o en otras formas de realización, de la misma fuente que el sujeto (por ejemplo humano). En otras formas de realización, el agente de hidrato de carbono es trehalosa. En ciertas formas de realización, al menos un agente tensioactivo es el copolímero de bloque EO-PO poloxamero 407, Pluronic F127®. En algunas composiciones de vacunas a virus vivos atenuados al menos un agente de hidrato de carbono es trehalosa. En ciertas composiciones de vacunas a virus vivos atenuados se incluye un copolímero de bloque EO-PO poloxamero 407, Pluronic F127® con una concentración desde 0,1 hasta 4% (p/v); y/o una concentración de albúmina sérica desde 0,001 hasta 3% (p/v) y/o la concentración de trehalosa puede ser desde 5 hasta 50% (p/v).

Composiciones farmacéuticas

[00061] Las formas de realización de la presente proporcionan la administración de composiciones a sujetos en una forma biológicamente compatible adecuada para la administración farmacéutica in vivo. Por "forma

000058

biológicamente compatible adecuada para administración in vivo" se entiende una forma del agente activo (*por ejemplo,* composición de virus vivo atenuado, vivo de las formas de realización) administrada en la que algunos efectos tóxicos son superados por los efectos terapéuticos del agente activo. La administración de una cantidad terapéuticamente efectiva de las composiciones terapéuticas se define como una cantidad efectiva, en dosis y durante períodos de tiempo necesarios para obtener un resultado deseado. Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto puede variar de acuerdo con factores tales como el estado de enfermedad, edad, sexo y peso del individuo y la capacidad de las formulaciones de inducir una respuesta deseada en el individuo. El régimen de dosis se puede ajustar para proporcionar la respuesta terapéutica óptima.

[00062] En algunas formas de realización, la composición (por ejemplo, agente químico farmacéutico, proteína, péptido una forma de realización) se puede administrar en una forma conveniente tal como subcutánea, intravenosa, por administración oral, inhalación, aplicación transdérmica, aplicación intravaginal, aplicación tópica, administración intranasal o rectal. En una forma de realización más particular, el compuesto se puede administrar por vía oral o subcutánea. En otra forma de realización, el compuesto se puede administrar por vía intravenosa. En una forma de realización, el compuesto se puede administrar por vía intranasal, tal como inhalación.

[00063] Un compuesto se puede administrar a un sujeto en un portador o diluyente adecuado en un portador o diluyente apropiado, coadministrado con la composición. El término "portador farmacéuticamente aceptable" como se usa en la

presente incluye diluyentes tales como soluciones salinas y de buffer acuoso. El agente activo también se puede administrar por vía parenteral o intraperitoneal. Las dispersiones también se pueden preparar en glicerol, polietilenglicoles líquidos y sus mezclas y aceites. En condiciones ordinarias de conservación y uso, estas preparaciones pueden contener un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

[00064] Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable se pueden administrar por medios conocidos en la técnica. Por ejemplo, se pueden usar soluciones acuosas estériles (cuando son hidrosolubles) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones inyectables estériles o dispersión. En todos los casos, la composición puede ser estéril y puede ser fluida en la medida que exista fácil inyectabilidad. También se puede conservar contra la acción contaminante de los microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador farmacéuticamente aceptable puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, y polietilenglicoles líquidos y similares), y sus mezclas adecuadas. La fluidez apropiada se puede mantener, por ejemplo, por el uso de una cobertura tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de la dispersión y por el uso de tensioactivos.

[00065] Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar por la incorporación de un compuesto activo en una cantidad con un solvente apropiado o con una o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según corresponda, seguido por esterilización.

[00066] Después de la formulación, las soluciones se pueden administrar de una manera compatible con la formulación de la dosis y en tal cantidad que sea terapéuticamente efectiva. Las formulaciones se administran fácilmente en una variedad de formas de dosis, tal como el tipo de soluciones inyectables descriptas anteriormente. Está contemplado que las cápsulas de liberación lenta, micropartículas de liberación programada, y similares también se pueden emplear para administrar las composiciones de la presente. Estas soluciones acuosas particulares son especialmente adecuados para la administración intravenosa, intramuscular, subcutánea e intraperitoneal.

[00067] Los agentes terapéuticos activos se pueden formular dentro de una mezcla puede incluir aproximadamente 0,0001 a 1,0 miligramos, o aproximadamente 0,001 a 0,1 miligramos, o aproximadamente 0,1 a 1,0 o aun aproximadamente 1 a 10 gramos por dosis. También se pueden administra una dosis única o dosis múltiples en un esquema apropiado para una situación predeterminada. En algunas formas de realización, las dosis se pueden administrar antes, durante y/o después de la exposición a un virus contemplado en la presente.

[00068] En otra forma de realización, las soluciones o spray nasales, aerosoles o inhalantes se pueden usar para administra el compuesto de interés. Las formulaciones adicionales que son adecuados para otros modos de administración incluyen supositorios y pesarios. También se puede usar un pesario o supositorio rectal. En general, en los supositorios, los aglutinantes y portadores tradicionales pueden incluir, por ejemplo,

polialquilenglicoles o triglicéridos; tales supositorios se pueden formar a partir de mezclas que contienen el ingrediente activo en el rango de 0,5% a 10%, con preferencia 1% a 2%.

[00069] Las formulaciones orales incluyen excipientes empleados normalmente tales como, por ejemplo, grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio y similares. En ciertas formas de realización, las composiciones farmacéuticas orales pueden incluir un diluyente inerte o portador comestible asimilable, o se puede encerrar en cápsulas de gelatina de cáscara dura o blanda o se pueden comprimir en comprimidos o se pueden incorporar directamente con el alimento de la dieta. Para la administración terapéutica oral, los compuestos activos se pueden incorporar con los excipientes y usar en la forma de comprimidos ingeribles, compuestos bucales, pastillas, cápsulas, elixires, suspensiones, jarabes, obleas y similares. Dichas composiciones y preparaciones deben contener al menos 0,1% del compuesto activo. El porcentaje de las composiciones y preparaciones, obviamente, se puede variar y puede estar convenientemente entre aproximadamente 2 a aproximadamente 75% del peso de la unidad, o con preferencia entre 25-60%. La cantidad de los compuestos activo en dichas composiciones terapéuticamente útiles es tal que permite obtener una dosis adecuada.

Kit

[00070] Otras formas de realización se refieren a los kits para usar con los métodos y las composiciones descriptas en la presente. Las composiciones y las

formulaciones de virus vivo se puede proveer en el kit. Los kits también pueden incluir un recipiente adecuado, composiciones de virus vivo atenuado, detalladas en la presente y opcionalmente uno o más agentes adicionales tal como otros agentes antivirales, antifúngicos o antibacterianos.

[00071] Los kits pueden incluir además una composición adecuadamente alicuotada para usar en un sujeto que lo necesita. Además, las composiciones de la presente pueden estar parcial o totalmente deshidratadas o acuosas. Los kits contemplados en la presente se pueden conservar a temperatura ambiente o a temperatura refrigerada como se describe en la presente de acuerdo con la formulación particular.

[00072] El recipiente de los kits generalmente incluirá al menos un vial, tubo de ensayo, frasco, botella, jeringa u otro o otro medio de recipiente, en el que se puede colocar la composición y con preferencia, alicuotado en forma adecuada. Cuando se proporciona un componente adicional, el kit generalmente contendrá uno o más recipientes adicionales en los que se puede colocar este agente o componente. Los kits de la presente normalmente también incluirán un medio para contener el agente, composición y otros recipientes de reactivo en aislamiento completo en escala comercial. Dichos recipientes pueden incluir recipientes de plástico de inyección o moldeado por soplado en los que están retenidos los viales.

EJEMPLOS

[00073] Los siguientes ejemplos se incluyen para demostrar ciertas formas de realización presentadas en la

presente. Los expertos en la materia deberán apreciar que las técnicas descriptas en los Ejemplos siguientes representan técnicas que se sabe que funcionan bien en las prácticas descriptas en la presente, y de este modo se puede considerar que constituyen modos preferidos para su práctica. Sin embargo, los expertos en la técnica deberán apreciar, a la luz de de la presente descripción que se pueden realizar muchos cambios en las formas de realización específicas que se describen y aún obtener resultados semejantes o similares sin apartarse del espíritu y alcance de la presente.

Ejemplo 1

Estabilidad de la base de flavivirus DEN-2 PDK 53 en fase líquida

[00074] En un método ilustrativo se investigó la estabilidad térmica para los flavivirus en fase líquida. De acuerdo con este método, se determinó la estabilidad de la base del vector de la vacuna origina DEN-2 PDK 53, conservado en solución salina amortiguada con fosfato (PBS), a temperaturas diferentes (Tabla 1). En un ejemplo, se incubó $1x10^4$ pfu de virus DEN-2 PDK 53 en un volumen total de 0,5 ml de PBS, en viales con tapa a rosca de 2 ml a 4 °C, temperatura ambiente (~ 21 °C) o 37 °C. Después de 24 horas de incubación, se determinó el título y la actividad viral por un ensayo de titulación en placa recubierta de agarosa con rojo neutro en células Vero. Como se ilustra en la Tabla 1, la incubación de DEN-2 PDK 53 en PBS a 4 °C produce una disminución promedio de 4 veces del título viral y pérdida completa de actividad viral cuando se incuba a 37 °C durante el mismo período. Estos

resultados demuestran una estabilidad relativamente escasa del flavivirus DEN-2 PDK 53 en ausencia de excipientes estabilizantes.

Tabla 1 Estabilidad del virus Den-2 PDK53 almacenado durante 24 horas a temperaturas diferentes.

Temperatura	Formulación	Porcentaje de pérdida de título viral
4 °C	PBS	75
~21 °C	PBS	78
37 °C	PBS	100

Ejemplo 2

Efectos estabilizantes de las composiciones

[00075] En ciertos ejemplos de composiciones, los excipientes farmacéuticamente aceptables contemplados en la presente que ayudan a la estabilidad térmica de las vacunas de virus vivo son conocidas en la técnica. En un ejemplo de método, se usó PBS como composición base para evaluar los efectos estabilizantes de diferentes excipientes. En estos ejemplos, se preparó una solución patrón de cada excipiente en PBS y el pH se ajustó a aproximadamente 7,1 con NaOH, excepto para quitosano donde el pH de la solución patrón se ajustó a aproximadamente 6,8. Los excipientes se diluyeron en PBS a las concentraciones finales indicadas (p/v) (Tabla 2). De acuerdo con este método, $1x10^4$ pfu de virus DEN-2 PDK 53, en medio libre de suero, se añadió a 0,5 ml de cada

composición y se almacenó a 37 °C durante 24 horas. Después de la incubación, se determinó la actividad y el título viral por titulación en placa en las células Vero, como se describió anteriormente. Como se ilustra en la Tabla 2, los efectos estabilizantes de las composiciones que incluyen un solo excipiente, a varias concentraciones comparables con los ejemplos experimentales previos, fueron mínimos. Sin embargo, algunos excipientes por ejemplo, trehalosa y albúmina sérica humana recombinante (rHSA), fueron más efectivos que otros en la estabilización del virus DEN-2 PDK 53 a 37 °C. Los resultados del estudio representado en la Tabla 2 también revelaron que el aumento de los efectos estabilizantes de varios excipientes, que incluyen rHSA y trehalosa, se puede obtener dentro de ciertos rangos de concentraciones de estos excipientes. En este ejemplo particular, la trehalosa fue más efectiva a concentraciones superiores al 15% (p/v) y copolimero poloxamero 407, F127® a concentraciones entre 0,5 y 3%.

Tabla 2 Efectos de diferentes excipientes sobre la estabilidad de DEN-2 PDK53 cuando se conserva a 37 °C durante 24 horas

Formulación	**Porcentaje de pérdida de título viral**
PBS	100,0
10% de sacarosa	99,9
15% de sacarosa	98,3
20% de sacarosa	96,4
25% de sacarosa	93,4
2% de trehalosa	98,3

000066

Formulación	Porcentaje de pérdida de título viral
5% de trehalosa	97,0
10% de trehalosa	93,3
15% de trehalosa	83,3
2% de manitol	100,0
5% de manitol	100,0
10% de manitol	99,8
15% de manitol	86,7
5% de sorbitol	100
10% de sorbitol	99,9
15% de sorbitol	99,9
1% de polivinilpirrolidona	100,0
5% de polivinilpirrolidona	100,0
10% de polivinilpirrolidona	100,0
0,2% de F127	99,6
0,5% de F127	99,6
1% de F127	99,5
2% de F127	99,5
10% de F127	99,9
0,1% de rHSA	91,2
0,5% de rHSA	95,0
1,0% de rHSA	89,0
3,0% de rHSA	89,0
5,0% de rHSA	97,5
0,05% de quitosano	99,0
0,1% de quitosano	99,0

000067

Ejemplo 3

Efectos estabilizantes de composiciones que incluyen combinaciones específicas de excipientes

[00076] En el siguiente procedimiento ilustrativo, se analizaron las composiciones que incluyen múltiples excipientes en diferentes combinaciones y concentraciones para estabilizar los efectos sobre la vacuna flaviviral DEN-2 PDK 53 original. Los excipientes se diluyeron en las concentraciones finales indicadas en PBS a partir de las soluciones patrón que se describen en el Ejemplo 2. Se incubaron $1x10^4$ pfu de virus vacunal DEN-2 PDK 53 a 37 °C en 0,5 ml de cada composición durante 21 horas (Fig. 1) o durante un período de 48 horas (Fig. 2). En los intervalos de tiempo especificados se determinó el título y la actividad viral por un ensayo de titulación de la placa como se describe en el ejemplo 1. La Fig. 1 representa ejemplos de resultados de esta demostración expresada como porcentaje del título viral restantes después de la incubación, con respecto a la entrada, y como pérdida de título log_{10} en la Fig. 2. El análisis de diferentes combinaciones de excipientes, en esta ilustración particular, reveló que las formulaciones que consisten en un sacárido, un tensioactivo no iónico copolímero plurónico y una proteína son óptimos para aumentar la estabilidad de DEN-2 PDK 53 a 37 °C. Las formulaciones que incluyen trehalosa, copolimero poloxamero 407, pluronic F127® y rHSA presentaron el mayor efecto estabilizante. En forma inesperada, el efecto estabilizante combinado de estos tres excipientes fue mucho mayor que la suma del que se observó con cada componente individual lo que sugiere sinergismo entre los componentes. El aumento de estabilidad térmica

000168

del flavivirus DEN-2 PDK 53 obtenido mediante las actividades sinérgicas de la combinación de trehalosa, copolimero poloxamero 407, pluronic F127® y rHSA no se podría haber previsto sobre la base de los ejemplos de la técnica previa. Las Fig 1 y 2 también ilustran que el efecto estabilizante de la mezcla de trehalosa/ copolimero poloxamero 407, pluronic F127®/rHSA mejoró adicionalmente con la adición de 0,05% de quitosano. La Fig. 2 muestra que la tasa de inactivación viral cuando se almacena durante un período de 48 horas a 37 °C se redujo significativamente en composiciones que contienen trehalosa, copolimero poloxamero 407, pluronic, F127® y rHSA. Los ejemplos de la técnica sugieren que la estabilidad de los flavivirus se puede aumentar con formulaciones que contienen cationes divalentes Ca^{2+} y Mg^{2+}. Sin embargo, como se representa en las Fig. 1 y 2, la adición de Ca^{2+} (0,0009 M) y Mg^{2+} (0,0005 M) a una formulación no confiere beneficios estabilizantes. Los resultados de la Fig. 2 sugieren que la adición de cationes divalentes puede tener un impacto negativo en la estabilidad viral en fase líquida a largo plazo en el contexto de las formas de realización.

[00077] En un ejemplo de método, se evaluó una composición que incluye trehalosa, copolimero poloxamero 407, pluronic F127® y rHSA en cuanto a sus propiedades estabilizantes con múltiples flavivirus. La estabilidad de los flavivirus DEN-2 quiméricos que expresan las proteínas de membrana y envoltura de los virus de Nilo occidental (DEN-2/WN), Dengue 1 (DEN-2/D1), Dengue 3 (DEN-2/D3, o Dengue 4 (DEN-2/D4) se determinó como se describió en el ejemplo 1. Los resultados ilustrativos de la Tabla 3 revelan el gran aumento de la estabilidad en fase líquida

000089

de todos los flavivirus quiméricos cuando se almacenan en una composición que incluye trehalosa, copolimero poloxamero 407, pluronic F127® y rHSA. Las diferentes quimeras expresan diferentes proteínas de envoltura y de membrana de cinco flavivirus serológicamente distintos. Además, el virus de Nilo occidental y los virus del dengue son significativamente divergentes. Este resultado sugiere que las composiciones de la presente pueden ser útiles para la estabilización en fase líquida de diversos miembros de la familia de Flaviviradae así como de otras familias de virus. La capacidad de estabilizar los flavivirus a temperatura ambiente (~21 °C) y a 4 °C se examinó por procedimientos representativos que se describieron para el ejemplo 1. Los ejemplos de resultados, ilustrados en la Tabla 4, revelan que una composición que incluye trehalosa, copolimero poloxamero 407, pluronic F127® y rHSA conserva efectivamente la actividad viral durante 7 días a 21 °C y durante 48 días a 4 °C.

Tabla 3. Estabilidad de diferentes flavivirus quiméricos almacenados a 37 °C durante 21 horas en PBS o una composición (F1) que incluye 15% de trehalosa, 2% de copolimero poloxamero 407, pluronic F127® y 1% de rHSA.

Virus	Formulación	% de título viral restante
DEN-2/WN	PBS	2
	F1	45
DEN-2/D1	PBS	0,2
	F1	22
DEN-2/D3	PBS	0,3
	F1	30

Virus	Formulación	% de título viral restante
DEN-2/D4	PBS	1
	F1	28

Tabla 4. Estabilidad de flavivirus almacenados a diferentes temperaturas durante 7 o 48 días en PBS o una composición (F1) que incluye 15% de trehalosa, 2% de copolimero poloxamero 407, pluronic F127® y 1% de rHSA.

Virus	Temperatura	Formulación	Porcentaje de título viral restante	
			7 días	48 días
DEN-2 PDK-53	21°C	PBS	0	0
	21°C	F1	100	0
	4°C	PBS	0	0
	4°C	F1	100	100
DEN-2/WN	21°C	PBS	0	0
	21°C	F1	100	0
	4°C	PBS	0	0
	4°C	F1	100	100

Ejemplo 4

Uso de componentes alternados

[00078] Otro ejemplo de método se usó para comparar los efectos estabilizantes de albúmina sérica bovina (BSA) y, gelatina con los de rHSA y copolímeros plurónicos

diferentes. Se realizaron ensayos de estabilidad viral DEN-2 PDK 53 como se describió previamente para los ejemplos 1 y 2. Los ejemplos previos sugirieron que las formulaciones que incluyen trehalosa, copolimero poloxamero 407, pluronic F127® y rHSA mejoraron óptimamente la estabilidad térmica del virus vacunal original DEN-2 PDK 53. Como se muestra en el ejemplo de la Fig. 3, los efectos estabilizantes de la albúmina sérica bovina son comparable con los rHSA solo o en combinación con trehalosa y copolimero poloxamero 407, pluronic F127®. La Fig. 3 también demuestra que como excipientes aislados, la gelatina es comparable con rHSA para estabilizar DEN-2 PDK 53 a 37 °C. Sin embargo en este ejemplo de método, a diferencia del BSA, la gelatina no parece ser un sustituto efectivo para rHSA en las composiciones que también contienen trehalosa y copolimero poloxamero 407, pluronic F127®. En consecuencia, mientras que las proteínas diferentes de rHSA se pueden usar en combinación con trehalosa y copolimero poloxamero 407, pluronic F127® para ayudar a la estabilización de las vacunas flavivirales, el uso de una albúmina sérica o proteínas relacionadas estrechamente es más adecuado de acuerdo con este ejemplo de método. Además, la Fig. 3 ilustra que, como excipientes aislados, el copolimero poloxamero Pluronic P123 es comparable con copolimero poloxamero 407, Pluronic F127® en su capacidad de estabilizar el virus DEN-2 PDK-53. Sin embargo, en este ejemplo de método, copolimero poloxamero 403, P123 no parece ser un sustituto efectivo para copolimero poloxamero 407, pluronic F127® en las composiciones que también contienen trehalosa y albúmina sérica. Como se ejemplifica en la Fig. 4, las composiciones que contienen trehalosa, rHSA y otros tensioactivos farmacéuticos usados comúnmente

tal como Polisorbato 20 (Tween 20), en vez de copolímero plurónico, no son efectivos para estabilizar DEN-2 PDK 53 con respecto a las formulaciones que contienen un copolímero plurónico. Estos ejemplos de métodos sugieren mejor eficiencia de estabilización de las formulaciones que contienen distintos tensioactivos de copolímero plurónico de alto peso molecular.

[00079] Los ejemplos de datos se ilustran adicionalmente en la Fig 4. La Fig. 4. representa la estabilidad del virus DEN-2 PDK 53 en las composiciones que contienen tensioactivos diferentes. DEN-2 PDK 53 se almacenó a 37 °C durante 23 horas en cada formulación. Los tensioactivos evaluados en este ejemplo incluyen n-octil-β-D-glucopiranósido (β-OG), Polisorbato 20 (P 20), Polisorbato 80 (P 80) y copolimero poloxamero 407, pluronic F127 (F). Otros componentes de la formulación incluyen trehalosa (T) y rHSA (A). Los valores se expresan como porcentaje del título viral restante después de la incubación respecto del título de entrada.

Ejemplo 5

Comparación de los efectos estabilizantes de diferentes composiciones

[00080] Las propiedades estabilizantes de un ejemplo de composición se compararon con las de las composiciones conocidas en la técnica. Una composición estabilizante para vacunas de flavivirus vivos, descripta en la técnica (patente U.S. N.° 4.500.512), incluye 4% de lactosa, 2% de sorbitol, 0,1 g/L de $CaCl_2$, 0,076 g/L de $MgSO_4$ y aminoácidos en el orden de 0,0005 M a 0,05 M en PBS. Otra composición informada por Adebayo et al (1998) consisten en

10% de sacarosa, 5% de lactalbúmina, 0,1 g/L de $CaCl_2$, y 0,076 g/L de $MgSO_4$. En un ejemplo de método, se compararon las propiedades estabilizantes de estas formulaciones con una forma de realización particular de la presente. En un ejemplo de composición, F1, esta composición incluye 15% de trehalosa, 2% de copolimero poloxamero 407, pluronic F127® y 1% de HSA recombinante. F2 es la formulación de la patente U. S. N.° 4.500.512 sin aminoácidos y F3 es la misma formulación con los aminoácidos histidina y alanina. F4 es la composición de Adebayo, et al. Se incubaron $1x10^4$ pfu de virus vacunal de DEN-2 PDK 53 a 37 °C en 0,5 ml de cada composición durante 23 horas, después de lo cual se analizó la actividad y título viral como se describió en el Ejemplo 1. Como se ejemplificó en la Fig. 5, algunas formas de realización, por ejemplo la formulación F1, representa una mejora significativa respecto de composiciones descriptas previamente. En el ejemplo mostrado, prácticamente no se recuperó actividad viral después del almacenamiento de las formulaciones conocidas en la técnica (formulaciones F3 y F4), mientras que se recuperó más de 50% del título viral inicial después del almacenamiento de una composición descripta en la presente. Estos resultados revelan que las formulaciones previas son ineficaces para promover la estabilidad del virus vivo durante el almacenamiento en fase líquida.

Ejemplo 6

Preservación de actividad viral después de múltiples congelamiento-descongelamiento

[00081] En un ejemplo de método, se demostró la capacidad de composiciones seleccionadas de conservar actividad viral

después de ciclos de congelamiento-descongelamiento. Se suspendieron $1x10^4$ pfu de virus vacunal de DEN-2 PDK 53 en 0,5 ml de cada composición en viales con tapa a rosca. Los viales del primer ciclo de congelamiento-descongelamiento se congelaron a -80 °C durante 24 horas y se descongelaron rápidamente a 37 °C. Esto fue seguido inmediatamente por un segundo ciclo de congelamiento-descongelamiento donde los viales se congelaron a -80 °C durante 1 hora y se e descongelaron rápidamente a 37 °C. Luego se evaluó el título y actividad viral con un ensayo de titulación en placa como se describió en el Ejemplo 1. Como se ilustra en la Fig. 6, las composiciones particulares que incluyen trehalosa, copolimero poloxamero 407, pluronic F127® y rHSA conservaron eficazmente la actividad viral completa a través de dos ciclos de congelamiento-descongelamiento. En forma adicional, las composiciones que incluyen estos tres excipientes fueron más eficaces que los que contienen solo un excipiente único. Los resultados de este experimento ilustrativo particular sugieren que las composiciones y los métodos descriptos en la presente son un crioprotector efectivo para las vacunas flavivirales y pueden facilitar la conservación viral durante el congelamiento-descongelamiento, secado por aspersión u otras técnicas de deshidratación.

Ejemplo 7

Estabilización de otros virus vivos atenuados.

[00082] Los ejemplos ilustrados previamente revelan la estabilización en fase líquida efectiva de varios flavivirus vivos atenuados en composiciones que incluyen trehalosa, copolimero poloxamero 407, pluronic F127® y

rHSA. Se prevé que las formas de realización descriptas en la presente también pueden ser efectivas para estabilizar otros virus vivos atenuados. Por ejemplo, una formulación que incluye trehalosa, copolimero poloxamero 407, pluronic F127® y rHSA se puede utilizar para estabilizar virus de sarampión vivo atenuado, un virus sindbis atenuado, un virus de influenza atenuado, un adenovirus atenuado, recombinante o un virus vaccinia atenuado recombinante. En un ejemplo de método, estos virus no flavivirales se pueden suspender y mantener en fase líquida, en una composición que incluye trehalosa, copolimero poloxamero 407, pluronic F127®, y rHSA directamente después de la recolección del cultivo celular. En otro método ilustrativo, los virus no flavivirales se pueden suspender en una composición antes, o después de congelar o secar por aspersión. La estabilidad viral aumentada estadísticamente puede demostrar que la formulación de esta forma de realización es aplicable a otras vacunas de virus atenuados fuera de la familia Flavivirus. Los expertos en la técnica reconocen que la aplicación luego se puede extender a otros virus vivos atenuados.

Ejemplo 8

Seguridad e inmunogenicidad *in vivo*.

[00083] Las interacciones moleculares entre los excipientes y componentes moleculares o celulares pueden servir, no solo para aumentar la estabilidad de las vacunas virales, sino también para producir aumento del daño celular o tisular *in vivo*. Las formulaciones pueden reducir la inmunogenicidad de estas vacunas virales en los animales vivos. En este ejemplo, se demuestra que los ejemplos de

composiciones son seguros después de la inyección subcutánea y son esencialmente inmunológicamente inertes. Se seleccionaron cuatro ejemplos de composiciones diferentes para analizar en ratones de la siguiente manera.

Formulación 1: 15% de trehalosa, 2% de F-127, 1% de rHSA

Formulación 2: 15% de trehalosa, 2% de F-127, 1% de rHSA, 1 mM de $CaCl_2$/ 0,5 mM de $MgSO_4$

Formulación 3: 15% de trehalosa, 2% de F-127, 1% de rHSA, 0,5% quitosano

Formulación 4: 22,5% de trehalosa, 3% de F-127, 1,5% de rHSA

Formulación 5: PBS

[00084] En ciertos métodos descriptos en la presente, se inmunizaron grupos de 8 ó 9 ratones NIH Swiss con inyección subcutánea con $1x10^5$ pfu de una vacuna de flavivirus recombinante DEN-2 PDK-53/WN formulada en el día 0 (d0), se administró un refuerzo con la misma vacuna formulada en el día d29 y luego se estimularon con 10^3 pfu de una cepa patogénica de Nilo occidental (NY99) el d45. Los ratones control (cuatro grupos de 8) recibieron formulaciones 1 - 4 solas sin virus. No se observaron efectos adversos después de la administración en ninguno de los ratones inmunizados. En consecuencia, en este ejemplo, no se producen eventos adversos evidentes con los ejemplos de formulaciones con o sin virus vacunal. Se recolectaron los sueros antes de la inmunización en d0, antes del refuerzo en d28, antes del estímulo en d44 y después del estímulo en d75. Los títulos del anticuerpo neutralizante del Nilo occidental en el suero se determinaron con la prueba de neutralización por

000077

reducción en placa (PRNT). Los resultados del estudio se representan en la Tabla 5.

Tabla 5: Anticuerpo neutralizante y protección inducida por las vacunas de DEN2/WN formuladas

		Pos-activación (d 28)		Pos-refuerzo (d44)		Pos-estímulo(d75)			
Formulación	Número	GMT[1]	% SC[2]	GMT	% SC	GMT	% SC	Supervivencia	% de Supervivencia
1	8	30	87,5	123	100	761	100	8/8	100
2	8	10	62,5	226	100	830	100	8/8	100
3	8	40	100	123	100	1810	100	8/8	100
4	9	10	66,7	137	100	1660	100	8/9	88,9
5	9	10	66,7	109	100	1742	100	9/9	100
Controles	32	1	0	1	0	1280	100	7/32	21,9

[1] GMT = título de media geométrica; a los títulos de <10 se les designó arbitrariamente valor de 1.

[2] % SC = porcentaje de animales que seroconvirtieron con títulos de PRNT >10.

[00085] La mayoría de los animales que recibieron la vacuna DEN-2/WN se seroconvirtieron después de la primera dosis independientemente de si no se usó una formulación (Formulación 5) o una de los ejemplos de formulaciones (Formulaciones 1 - 4). Además, todos los animales vacunados se seroconvirtieron después de la administración del refuerzo. La media geométrica de los títulos de PRNT (GMT) demuestra pocas diferencias entre los grupos de vacunas. Los títulos fueron bajos después de la primera inmunización, aumentaron 3 - 10 veces después del refuerzo y luego mostraron una respuesta anamnésica marcada después del estímulo. 100% de todos los animales vacunados sobrevivió al estímulo, nuevamente en forma independiente

000078

de la formulación de la vacuna. Solo el 22% de los animales control sobrevivieron; los que sobrevivieron mostraron evidencia de potentes respuestas anticuerpos neutralizantes después del estímulo. Una ventaja es que este ejemplo demuestra que los ejemplos de las formulaciones no reducen la capacidad de un ejemplo de vacuna de DEN-2/WN recombinante de prevenir la enfermedad de Nilo occidental en los ratones.

Ejemplo 9

[00086] En otro ejemplo, se usaron composiciones líquidas que contienen trehalosa, rHSA y copolimero poloxamero 407, pluronic F127® para estabilizar un flavivirus quimérico de Nilo occidental almacenado durante varios períodos a 25 °C o 4 °C. Se incubaron $1x10^4$ pfu de virus vacunal DEN-2/WN quimérico a cada temperatura y se evaluó la actividad viral a intervalos de una o dos semanas como se describió en el Ejemplo 1. Como se ilustra en las Fig 7 y 8, las formulaciones que contienen trehalosa, rHSA y copolimero poloxamero 407, pluronic F127® aumentaron significativamente la estabilidad térmica del virus vacunal DEN-2/WN durante el almacenamiento a 25 °C y 4 °C, respectivamente. A 25°C la pérdida de actividad viral fue menor de un log durante 7 días. At 4 °C la inactivación viral fue despreciable durante períodos de hasta 12 semanas cuando se almacenaron ejemplos de formulaciones que incluyen trehalosa, copolimero poloxamero 407, pluronic F127® y rHSA.

Ejemplo 10

[00087] En otro ejemplo de método, se demostraron efectos estabilizantes de composiciones que incluyen trehalosa,

rHSA y un copolímero plurónico con vacunas de DEN-2 PDK 53 deshidratadas. Se formularon $1x10^4$ pfu de virus vacunal DEN-2 PDK 53 de acuerdo con los procedimientos descriptos en la presente. Las vacunas formuladas se colocaron en viales de suero y se sometieron a procedimientos de liofilización convencionales. Las vacunas secas se taparon al vacío, se almacenaron a 37 °C o 4 °C durante 14 días seguido por la reconstitución de la vacuna a su volumen de líquido original por la adición de agua estéril. Se evaluó la actividad viral de la vacuna reconstituida como se describió antes. A 37°C, en presencia de las composiciones que contienen trehalosa, rHSA y un copolímero plurónico formulado en solución salina amortiguada con fosfato, se observó una pérdida de título viral promedio de 1 (Fig. 9). No se observó pérdida de actividad viral para las vacunas virales formuladas de DEN-2 PDK 53 deshidratadas almacenadas a 4 °C durante 14 días. Estos resultados demuestran la eficaz conservación de una vacuna viral deshidratada que utiliza las composiciones descriptas en la presente.

[00088] La Fig. 9. representa la estabilidad de DEN-2 PDK 53 liofilizada a temperaturas diferentes. Se evaluó la pérdida de título del virus vacunal de DEN-2 PDK 53 liofilizada formulada después de la incubación a 37°C o 4°C durante 2 semanas según se indicó. Las formulaciones F1 (15% de trehalosa, 2% de copolimero poloxamero 407, pluronic F127®, 1% de rHSA) y F2 (15% de trehalosa, 2% de copolimero poloxamero 407, pluronic F127®, 0,01% de rHSA) se formularon en solución salina amortiguada con fosfato. La formulación F3 (15% de trehalosa, 2% de copolimero

poloxamero 407, pluronic F127®, 0,01% de rHSA) se formuló en 10 mM de base Tris.

[00089] Todas las COMPOSICIONES y MÉTODOS descriptos y reivindicados en la presente se pueden realizar y ejecutar sin experimentación indebida a la luz de la presente descripción. Si bien las composiciones y los métodos se han descripto en términos de formas de realización preferidas, es evidente para los expertos en la técnica que se pueden aplicar variaciones a las COMPOSICIONES y MÉTODOS y en las etapas o en la secuencia de etapas de los métodos descriptos en la presente sin apartarse del concepto, espíritu y alcance de la presente. Más específicamente, ciertos aspectos que están química y fisiológicamente relacionados se pueden sustituir con los agentes descriptos en la presente mientras que se obtengan resultados iguales o similares. Todos estos sustitutos similares y modificaciones evidentes para los expertos en la técnica se consideran dentro del espíritu, alcance y concepto de las reivindicaciones adjuntas.

[00090] Todos los documentos o porciones de los documentos citados en esta solicitud, que incluyen pero sin limitación a patentes, solicitudes de patentes, artículos, libros y tratados, están expresamente incorporados por referencia en su totalidad.

REIVINDICACIONES

1. Una composición de virus vivos atenuados que comprende:

uno o más virus vivos atenuados;

uno o más copolímeros de bloque (EO-PO)poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) poloxamero 407, pluronic, el uno o más copolímeros en bloque de EO-PO incluyen poloxamero 407 (Pluronic F127)

uno o más agentes de proteínas,

una o más albúminas, y

uno o más agentes de hidrato de carbono, en donde el uno o más agentes de hidrato de carbono incluye al menos uo o más de trehalosa y quitosan

siendo la composición suceptibel de reducir la inactivación del virus vivo atenuado.

2. La composición de virus de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los virus vivos atenuados son seleccionados del grupo que consiste de las familias Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Herpesvirus, Poxvirus y combinaciones de los mismos.

3. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1 ó la reivindicación 2, en donde los virus vivos atenuados son Flavivirus.

4. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1 a 3, en donde la composición está adaptada para estar en forma acuosa.

5. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición está adaptada para estar parcial o totalmente deshidratada.

6. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más agentes proteicos son derivados de albúmina sérica de una especie de vertebrado.

7. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente proteíco es albúmina sérica y el agente de hidrato de carbono es trehalosa.

8. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 7, en donde la concentración poloxamero 407 es desde 0,1 hasta 4% (p/v), en donde la concentración de albúmina sérica es desde 0,001 hasta 3% (p/v) y la concentración de trehalosa es desde 5 hasta 50% (p/v).

9. Un método para disminuir la inactivación de una composición de virus vivo atenuado que comprende obtener uno o más virus vivos atenuados y combinar dichos virus con una composición que comprende uno o más copolímeros de bloque (EO-PO) poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) poloxamero 407, pluronic, el uno o más copolímeros en bloque EO-PO incluyen poloxamero 407 (Pluronic F127), uno o más agentes proteicos que son una o más albúminas, y uno o más hidratos de carbono que al menos incluyen uno o más de trehalosa y quitosano, en donde la composición es susceptible de reducir la inactivación del virus vivo atenuado.

10. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde los virus vivos atenuados se seleccionan del grupo que consiste de las familias Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Herpesvirus, Poxvirus y combinaciones de los mismos.

11. El método de acuerdo con la reivindicación 9, que además comprende deshidratar parcial o totalmente la combinación.

12. El método de acuerdo con la reivindicación 11, que además comprende rehidratar parcial o totalmente la combinación antes de la administración.

13. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la composición incrementa la vida de depósito de una composición viral acuosa.

14. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la composición disminuye la inactivación de un virus vivo atenuado acuoso durante 24 horas o más.

15. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde la composición disminuye la inactivación de un virus vivo atenuado acuoso durante uno o más ciclos de congelamiento y descongelamiento.

16. El método de acuerdo con la reivindicación 9, en donde uno o más de los agentes proteicos es albúmina sérica, y uno de los agentes de hidratos de carbono es trehalosa.

17. Un kit para disminuir la inactivación de una composición a virus vivos atenuados que comprende:

al menos un contenedor; y

una composición que comprende uno o más agentes proteicos que son una o más albúminas, uno o más agentes de hidratos de carbono que incluyen al menos uno o más de trehalosa y quitosano, y uno o más copolímeros de bloque (EO-PO) poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) poloxamero 407, el uno o más copolímeros en bloque EO-PO incluyen poloxamero 407 (Pluronic F127), en donde la composición disminuye la inactivación de un virus vivo atenuado.

18. El kit de acuerdo con la reivindicación 17, en donde al uno o más agentes proteicos es albúmina sérica, y uno o más agentes de hidratos de carbono es trehalosa.

19. El kit de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la concentración de trehalosa es desde 5 hasta 50% (p/v).

20. El kit de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la concentración de copolímeros de bloque (EO-PO) poli(óxido de etileno) y poli(óxido de propileno) es desde 0,1 hasta 4% (p/v).

21. El kit de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la concentración de una o más albúminas séricas es desde 0,001 hasta 3% (p/v).

22. El kit de acuerdo con la reivindicación 17, en donde la composición también comprende uno o más virus vivos atenuados.

000085

23. El kit de acuerdo con la reivindicación 21, en donde los virus vivos atenuados son seleccionados del grupo que consiste de las familias Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Herpesvirus, Poxvirus y combinaciones de los mismos.

RESUMEN

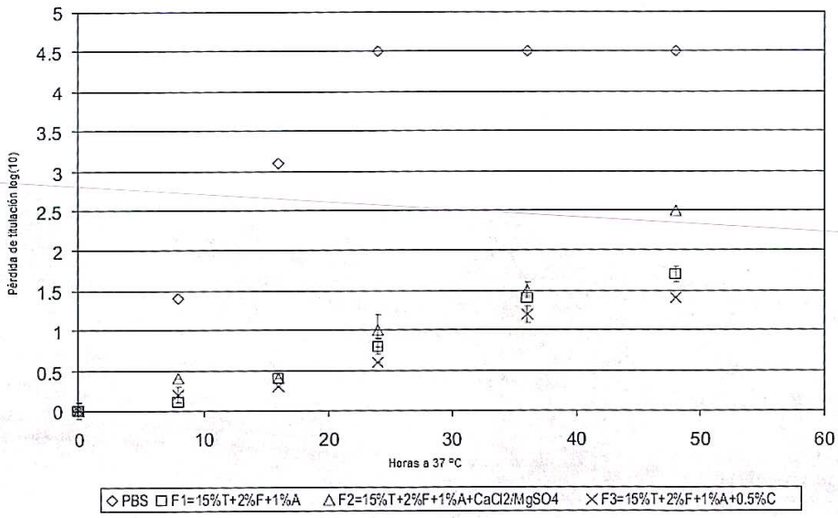
Las formas de realización de la presente se refieren a composiciones y métodos para virus vivos. En ciertas formas de realización, una composición a virus vivo atenuado incluye, sin limitaciones, uno o más virus vivos atenuados y composiciones para reducir la inactivación y/o degradación del virus vivo atenuado. En otras formas de realización, la composición de virus vivo atenuado puede ser una composición de vacuna. En aún otras composiciones, una composición a virus vivo atenuado puede incluir al menos un hidrato de carbono, al menos una proteína y al menos un agente tensioactivo de alto peso molecular para reducir la inactivación y/o degradación del virus vivo atenuado.

000087

Fig. 1

15%T+2%F+2%A
15%T+2%F+1%A+0.05%C
15%T+2%F+1%A+CaCl2/MgSO4
15%T+2%F+1%A
2%F+1%A
2%F+0.05%C
15%T+0.05%C
15%T+2%A
15%T+1%A
15%T+2%F
0.1% quitosano
0.05% quitosano [C]
2%rHSA
1%rHSA (A)
2% F127
1% F127 (F)
15% trehalosa (T)
PBS
Formulación
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
45.0
50.0
Porcentaje viral de resto de titulación

Fig. 2

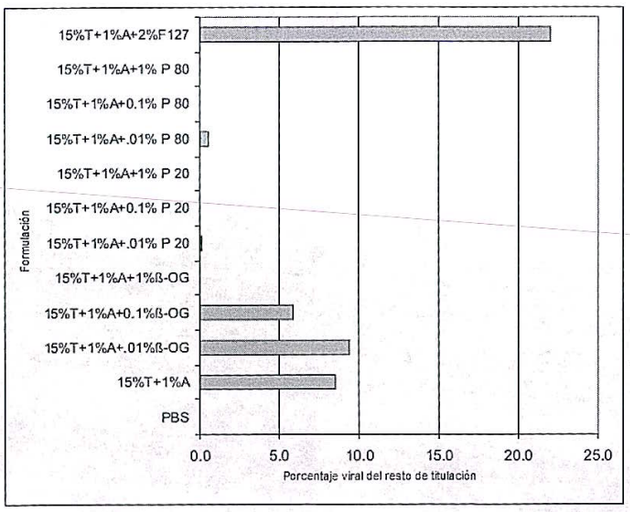

Pérdida de titulación log(10)
5
4.5
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
0.5
0
0
10
20
30
40
50
60
Horas a 37 ºC
◇ PBS □ F1=15%T+2%F+1%A △ F2=15%T+2%F+1%A+CaCl2/MgSO4 ✕ F3=15%T+2%F+1%A+0.5%C

000089

Fig.3

15% T + 1% F68 + 1% rHSA
15% T + 2% P123 + 1% rHSA
15% T + 2% F127 + 1.0% G
15% T + 2% F127 + 2% BSA
15% T + 2% F127 + 1% BSA
15% T + 2% F127 + 1% rHSA
2% P123 + 1% rHSA
2% F127 + 1% rHSA
2.0% gelatina
1.0% gelatina
0.1% gelatina (G)
2% BSA
1% BSA
1% rHSA
1% F68
5% P-123
2% P-123
1% P-123
2% F127
15% trehalosa (T)
PBS
Formulación
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
30.0
35.0
40.0
Porcentaje viral de resto de titulación

Fig. 4


15%T+1%A+2%F127
15%T+1%A+1% P 80
15%T+1%A+0.1% P 80
15%T+1%A+.01% P 80
15%T+1%A+1% P 20
15%T+1%A+0.1% P 20
15%T+1%A+.01% P 20
15%T+1%A+1%ß-OG
15%T+1%A+0.1%ß-OG
15%T+1%A+.01%ß-OG
15%T+1%A
PBS
Formulación
0.0
5.0
10.0
15.0
20.0
25.0
Porcentaje viral del resto de titulación

160000

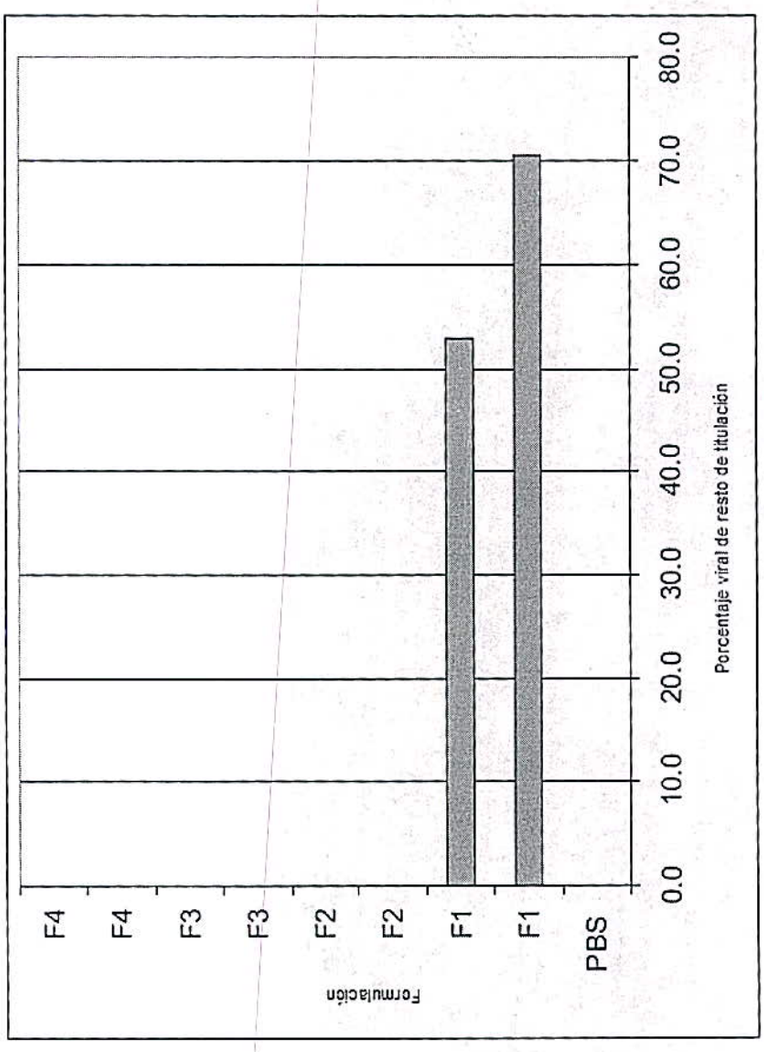

Formulación
F4
F4
F3
F3
F2
F2
F1
F1
PBS
0.0
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
60.0
70.0
80.0
Porcentaje viral de resto de titulación

Fig. 5

Fig. 6

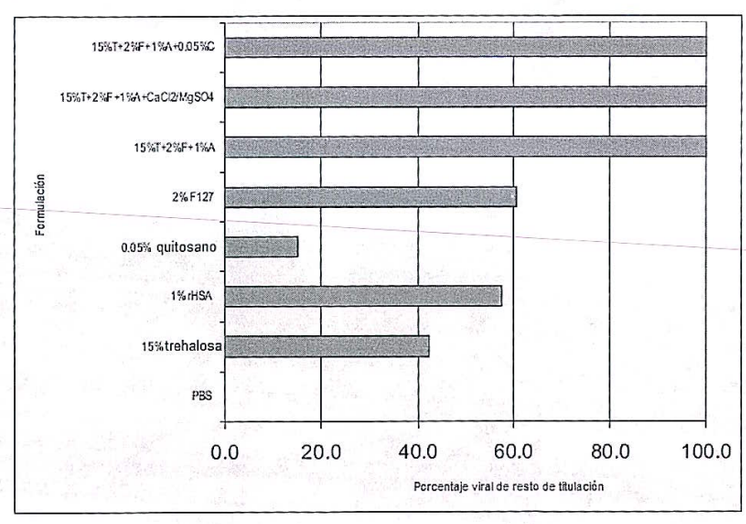
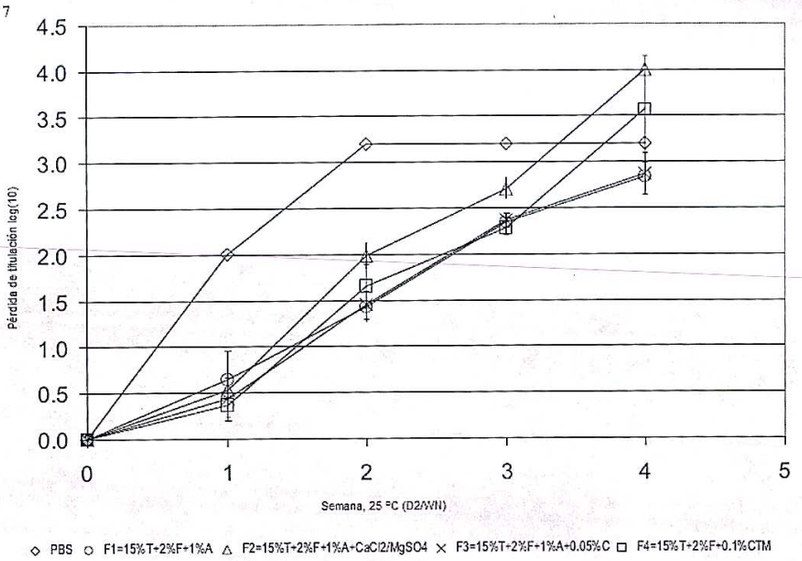

15%T+2%F+1%A+0.05%C
15%T+2%F+1%A+CaCl2/MgSO4
15%T+2%F+1%A
2%F127
0.05% quitosano
1%rHSA
15%trehalosa
PBS
Formulación
0.0
20.0
40.0
60.0
80.0
100.0
Porcentaje viral de resto de titulación

Fig. 7

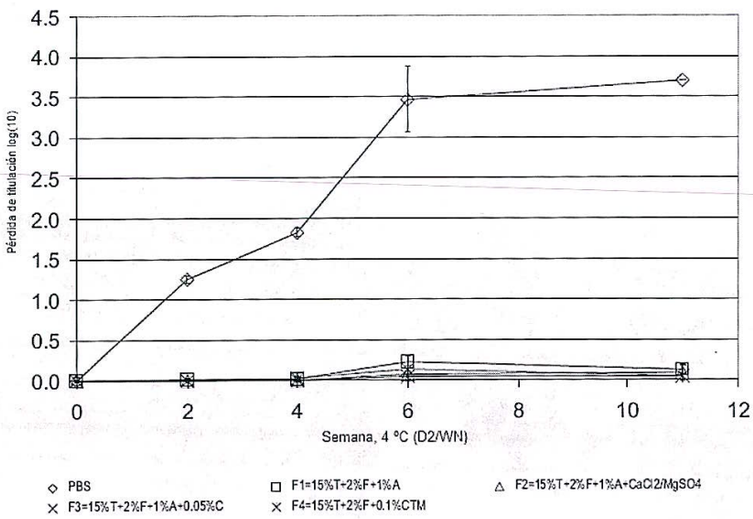


◇ PBS ○ F1=15%T+2%F+1%A △ F2=15%T+2%F+1%A+CaCl2/MgSO4 × F3=15%T+2%F+1%A+0.05%C □ F4=15%T+2%F+0.1%CTM

60

000094

Fig. 8


4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
Pérdida de titulación log(10)
0
2
4
6
8
10
12
Semana, 4 °C (D2/WN)
◇ PBS
□ F1=15%T+2%F+1%A
△ F2=15%T+2%F+1%A+CaCl2/MgSO4
× F3=15%T+2%F+1%A+0.05%C
× F4=15%T+2%F+0.1%CTM

000095

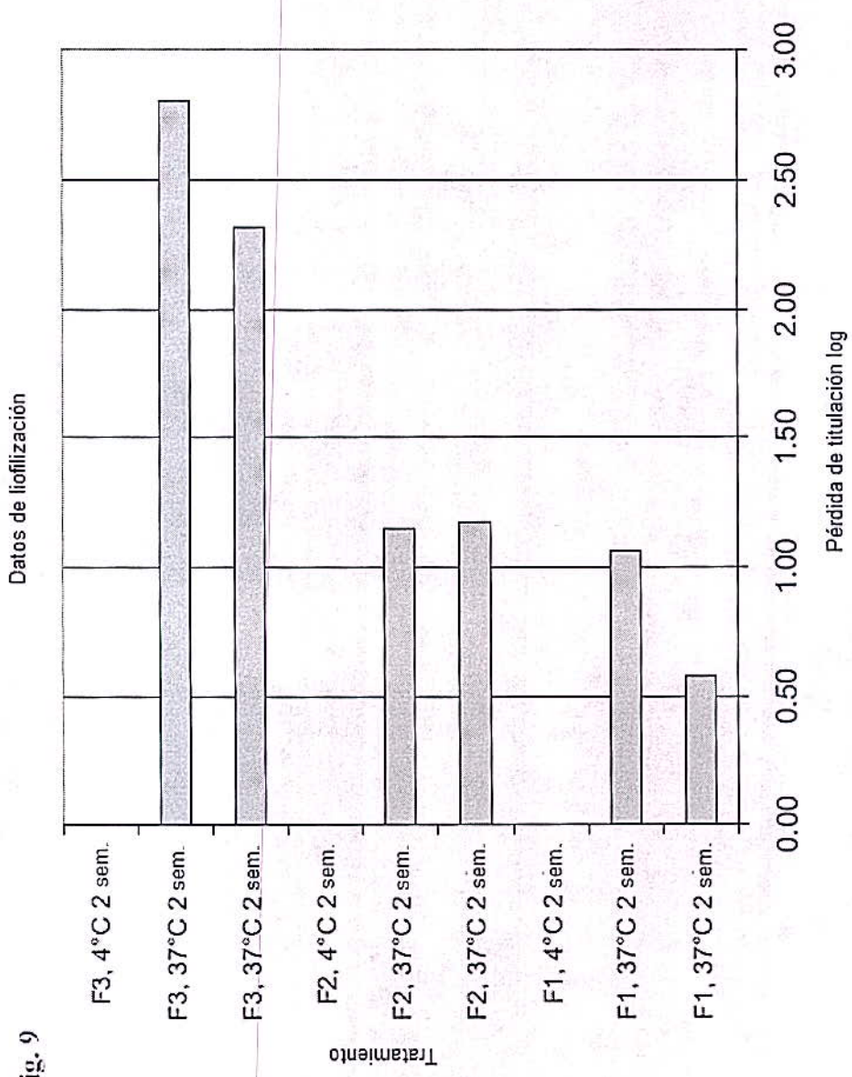

Datos de liofilización
F3, 4°C 2 sem.
F3, 37°C 2 sem.
F3, 37°C 2 sem.
F2, 4°C 2 sem.
F2, 37°C 2 sem.
F2, 37°C 2 sem.
F1, 4°C 2 sem.
F1, 37°C 2 sem.
F1, 37°C 2 sem.
Tratamiento
0.00
0.50
1.00
1.50
2.00
2.50
3.00
Pérdida de titulación log

Fig. 9

000096