



Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA



PCT

**SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION**

09-123789



21. EXPEDIENTE N° _____

54. TÍTULO MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA VIRUS VIVOS

ATENUADOS.

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL C12N 7/04

71. SOLICITANTE INVIRAGEN, INC.

DOMICILIO Fort Collins, Colorado, Estados Unidos de América.

74. APODERADO DILIA MARIA RODRIGUEZ D'ALEMAN

22. BOGOTÁ, D.C. _____



No. 09-123789- -00000-0000

Fecha: 2009-11-03 16:18:02
Tra. 11 PATENTE IYI
Act. 411 PRESENTACION

Dep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 378 FASE NACIONAL
Folios: 104

**FORMULARIO ÚNICO DE SOLICITUD DE PATENTE
PCT
ENTRADA EN FASE NACIONAL**

SOLICITUD DE:

☒

Patente de Invención

☐

Patente de Modelo de Utilidad

☒

Capítulo I

☐

Capítulo II

2
SOLICITANTE
(71)

Nombre: **INVIRAGEN, INC.**

Dirección: 2619 Midpoint Drive, Suite A, Fort, Collins, Colorado 80525, Estados Unidos de América.

Nacionalidad o domicilio: Fort Collins, Colorado, Estados Unidos de América.

Lugar de Constitución: Colorado, Estados Unidos de América.

Teléfono:

Fax:

E-mail:

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☐

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número

3
**REPRESENTANTE
O APODERADO**
(74)

Nombre: **DILIA MARÍA RODRÍGUEZ
D'ALEMAN**

Dirección: Carrera 11 No. 86-53, piso 6

Teléfono: 6 181088

Fax: 6350824

E-mail: clarkemodet@clarkemodet.com.co

IDENTIFICACIÓN

C.C.

☒

NIT

☐

C.E.

☐

Otro

☐

Número

41.654.882

TP

20824 CSJ

4
INVENTOR (ES)
(72)

Nombre: **VER HOJA ANEXA**

Dirección:

Nacionalidad o domicilio:

5 **PCT (86)**

Solicitud Internacional No: PCT/US2008/059472

Fecha 4 de abril de 2008

Publicación Internacional No: WO 2009/014774 A1

Fecha 29 de enero de 2009

6 TÍTULO (54) MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA VIRUS VIVOS ATENUADOS.

7 Clasificación Internacional (51) C12N 7/04

8 Prioridad

(33) País de Origen

Estados Unidos de América

(32) Fecha

6 de abril de 2007

(31) Número de Solicitud

60/910,579

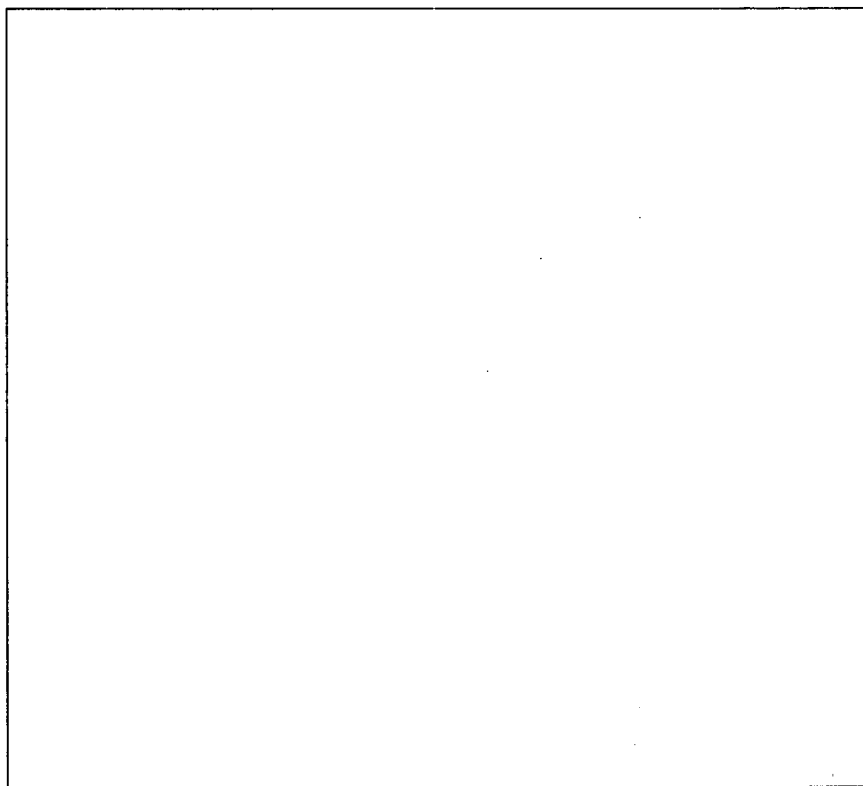
SI ☒ NO ☐

9 Comprobante de pago No: 09-76.205 // 09-69.072 // 09-69.073 // 09-69.230

Fecha 09/10/09 // 15/09/09 // 15/09/09 // 15/09/09

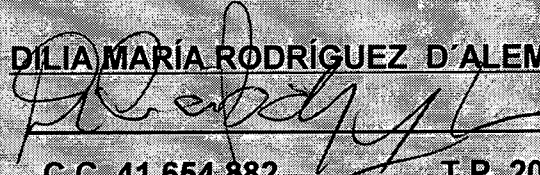
- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica
- ☐ Poderes si fuere el caso
- ☐ Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante
- ☐ Declaraciones
- ☒ Copia de la solicitud internacional. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano. (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA).
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ De ser el caso copia de contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas
- ☐ De ser el caso, certificado de deposito del material biológico
- ☐ Arte final 12 X 12 .
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionadas parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional
- ☒ Otros *Opinión escrita

11 FIGURA CARACTERÍSTICA



12 Solicito la concesión de la patente

NOMBRE : DILIA MARÍA RODRÍGUEZ D'ALEMAN

FIRMA: 

C.C. 41.654.882

T.P. 20824

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 76,205
FECHA : OCTUBRE 9 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-123789- -00000-0000

Fecha: 2009-11-03 16:18:02 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 104

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CD. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	130829171	08/10/2009	76,140,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	540,000.00
		TOTAL :	\$ 540,000.00

SON: QUINIENTOS CUARENTA MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

7-2347
2



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 69,072

FECHA : SEPTIEMBRE 15 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-123789-00000-0000

Fecha: 2009-11-03 16:18:02 Dep. 2020 NUECREACION
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 104

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	110620134	15/09/2009	49,098,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	
		99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	200,000.00
		TOTAL :	\$ 200,000.00

SDN: DOSCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 09 - 69,073

FECHA : SEPTIEMBRE 15 DE 2009

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-123789-00000-0000

Fecha: 2009-11-03 16:18:02
Tra. 11 PATENTEIYII
Act. 411 PRESENTACION
Dep. 2020 NUECREACIONE
Eve: 378 FASENACIONALI
Folios: 104

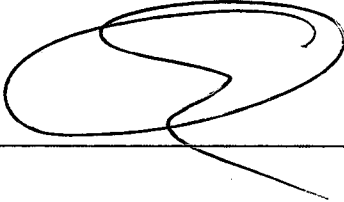
**** CONSIGNACION ****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMBIA	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	110620134	15/09/2009	49,098,000.00

**** CONCEPTO ****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS
			TOTAL : \$ 200,000.00

SUN: DOSCIENTOS MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ESTA CERTIFICACION DE EXCEDENTE DE PAGO SOLO PODRA SER UTILIZADA
COMO PARTE DE LA CANCELACION DE UNA TARIFA VIGENTE Y NO PODRA SER
SUSTITUIDA POR NINGUN RECIBO.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 09-123789- -00000-0000

Fecha: 2009-11-03 16:18:02 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 104

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 69,230
FECHA : SEPTIEMBRE 15 DE 2009

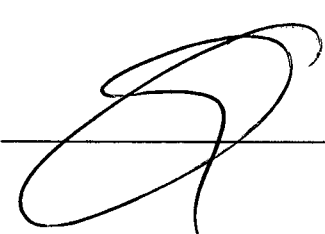
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
CLARKE MODET Y CO. COLOMB	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	110620134	15/09/2009	49,098,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-09	OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	54 INFORMACION DETALLADA DE UN TRAMI
			TOTAL : \$ 25,000.00

SON: VEINTICINCO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

ANEXOS

INVENTORES

1.)

STINCHCOMB, Dan T.

(8409 County Road 3, Fort Collins, Colorado 80528, Estados Unidos de América);

2.)

OSORIO, Jorge E.

(560 Highway 78 South, Mount Horeb, Wisconsin 53572, Estados Unidos de América);

3.)

WIGGAN, O'Neil

(1600 West Plum Street, Fort Collins, Colorado 80521, Estados Unidos de América).

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.

MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA 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.º 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 expresar 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. Entre 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 es 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 su 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 Pluronic F127, Pluronic F68, 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 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 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 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 polímero 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 ($\text{Ca}^{+2}/\text{Mg}^{+2}$).

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.º 4.500.512). La patente de los Estados Unidos N.º 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 después de la resuspensión, la vacuna de fiebre amarilla continúa siendo 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.º 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 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 (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 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 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}-$ designado EO) y óxido de polipropileno ($-\text{CH}_2\text{CHCH}_3\text{O}-$ designado PO). El bloque de PO puede estar flanqueado por dos bloques de EO en una disposición $\text{EO}_x\text{-PO}_y\text{-EO}_x$. 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 $\text{EO}_x\text{-PO}_y\text{-EO}_x$. 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 Pluronic F127 o 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 crioprotector 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 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 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 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% 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 1×10^4 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, 1×10^4 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 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
5% de trehalosa	97,0
10% de trehalosa	93,3
15% de trehalosa	83,3

Formulación	Porcentaje de pérdida de título viral
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

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 1×10^4 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, 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 del flavivirus DEN-2 PDK 53 obtenido mediante las actividades sinérgicas de la combinación de trehalosa, 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/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, 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, 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 de todos los flavivirus quiméricos cuando se almacenan en una composición que incluye trehalosa, 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, 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 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
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 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, 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 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 F127. En consecuencia, mientras que las proteínas diferentes de rHSA se pueden usar en combinación con trehalosa y 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 polímero Pluronic P123 es comparable con Pluronic F127 en su capacidad de estabilizar el virus DEN-2 PDK-53. Sin embargo, en este ejemplo de método, P123 no parece ser un sustituto efectivo para 127 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-glucopiranosido (β -OG), Polisorbato 20 (P 20), Polisorbato 80 (P 80) y 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, descrita en la técnica (patente U.S. N.º 4.500.512), incluye 4% de lactosa, 2% de sorbitol, 0,1 g/L de CaCl_2 , 0,076 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 F127 y 1% de HSA recombinante. F2 es la formulación de la patente U. S. N.º 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 1×10^4 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 descrita 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 1×10^4 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 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, 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 descritos 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, F127 y rHSA. Se prevé que las formas de realización descritas en la presente también pueden ser efectivas para estabilizar otros virus vivos atenuados. Por ejemplo, una formulación que incluye trehalosa, 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, 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 1×10^5 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 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)			
Formul ación	Número	GMT ¹	% SC ²	GMT	% SC	GMT	% SC	Supervi vencia	% de Supervi vencia
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
Contro les	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 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 F127 para estabilizar un flavivirus quimérico de Nilo occidental almacenado durante varios períodos a 25 °C o 4 °C. Se incubaron 1×10^4 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 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. A 4 °C la inactivación viral fue despreciable durante períodos de hasta 12 semanas cuando se almacenaron ejemplos de formulaciones que incluyen trehalosa, 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 1×10^4 pfu de virus vacunal DEN-2 PDK 53 de acuerdo con los procedimientos descritos 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 descritas 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 F127, 1% de rHSA) y F2 (15% de trehalosa, 2% de F127, 0,01% de rHSA) se formularon en solución salina amortiguada con fosfato. La formulación F3 (15% de trehalosa, 2% de F127, 0,01% de rHSA) se formuló en 10 mM de base Tris.

[00089] Todas las COMPOSICIONES y MÉTODOS descritos 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 descrito 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 descritos 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 descritos 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 agentes tensioactivos de alto peso molecular;

uno o más agentes de proteínas, y

uno o más agentes de hidrato de carbono

en donde la composición es capaz de reducir la inactivación del 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 sus combinaciones.

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

4. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición está en forma acuosa.

5. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde la composición está parcialmente o totalmente deshidratada.

6. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente tensioactivo tiene un peso molecular de 1500 o mayor.

7. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los agentes tensioactivos comprenden uno o más copolímeros en el peso molecular del agente tensioactivo es de 3000 o mayor.

8. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente tensioactivo consiste de uno o más copolímeros de bloque EO-PO.

9. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde los agentes proteicos se seleccionan del grupo que consiste de lactalbúmina, albúmina sérica, α -fetoproteína, proteína fijadora de vitamina D, afamina derivada de una especie de vertebrado y una de sus combinaciones.

10. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente proteico es albúmina sérica derivada de una especie de vertebrado.

11. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente de hidrato de carbono es al menos uno de un sacárido, un poliol o una de sus combinaciones.

12. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde uno o más de los agentes de hidrato de carbono se selecciona del grupo que consiste de trehalosa,

sacarosa, quitosano, sorbitol, manitol y una de sus combinaciones.

13. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente de hidrato de carbono es trehalosa.

14. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 1, en donde al menos un agente tensioactivo es copolímero de bloque EO-PO Pluonic F127, al menos un agente de proteína es albúmina sérica, y al menos un agente de hidrato de carbono es trehalosa.

15. La composición viral de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la concentración de copolímero de bloque EO-PO Pluronic F127 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).

16. Un método para disminuir la inactivación de una composición de virus vivo atenuado que comprende combinar uno o más virus vivos atenuados con una composición que comprende uno o más agentes tensioactivos de alto peso molecular, uno o más agentes proteicos, y uno o más hidratos de carbono en donde la composición es capaz de reducir la inactivación del virus vivo atenuado.

17. El método de acuerdo con la reivindicación 16, 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 sus combinaciones.

18. El método de acuerdo con la reivindicación 16, que además comprende deshidratar parcialmente o totalmente la combinación.

19. El método de acuerdo con la reivindicación 18, que además comprende rehidratar parcialmente o totalmente la combinación antes de la administración.

20. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la composición incrementa la vida de depósito de una composición viral acuosa.

21. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la composición disminuye la inactivación de un virus vivo atenuado acuoso durante 24 horas o más.

22. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la composición disminuye la inactivación de un virus vivo atenuado acuoso durante uno o más ciclos de congelamiento y descongelamiento.

23. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde al menos un agente tensioactivo de alto peso molecular es un copolímero de bloque EO-PO Pluronic F127, al menos uno de los agentes proteicos es albúmina sérica, y al menos uno de los agentes de hidratos de carbono es trehalosa.

24. El método de acuerdo con la reivindicación 16, en donde la composición viral se administra a un sujeto para reducir el inicio o prevenir una condición de salud.

25. El método de acuerdo con la reivindicación 24, en donde la condición de salud se selecciona del grupo que consiste de infección del Nilo Occidental, fiebre dengue, encefalitis japonesa, enfermedad del bosque Kyasanur, encefalitis de valle Murray, encefalitis de San Luis, encefalitis portada por ácaros, fiebre amarilla e infección por virus de hepatitis C.

26. 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, uno o más agentes de hidratos de carbono, y uno o más agentes tensioactivos de alto peso molecular, en donde la composición disminuye la inactivación de un virus vivo atenuado.

27. El kit de acuerdo con la reivindicación 26, en donde al menos un agente tensioactivo es un copolímero de bloque EO-PO Pluronic F127, al menos un agente proteico es albúmina sérica, y al menos un agente de hidrato de carbono es trehalosa.

28. El kit de acuerdo con la reivindicación 27, en donde la concentración de trehalosa es desde 5 hasta 50% (p/v).

29. El kit de acuerdo con la reivindicación 27, en donde la concentración del polímero de bloque EO-PO Pluronic F127 es desde 0,1 hasta 4% (p/v).

30. El kit de acuerdo con la reivindicación 27, en donde la concentración de albúmina sérica es desde 0,001 hasta 3% (p/v).

31. El kit de acuerdo con la reivindicación 26, en donde la composición también comprende uno o más virus vivos atenuados.

32. El kit de acuerdo con la reivindicación 31, 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 sus combinaciones.

Fig. 1

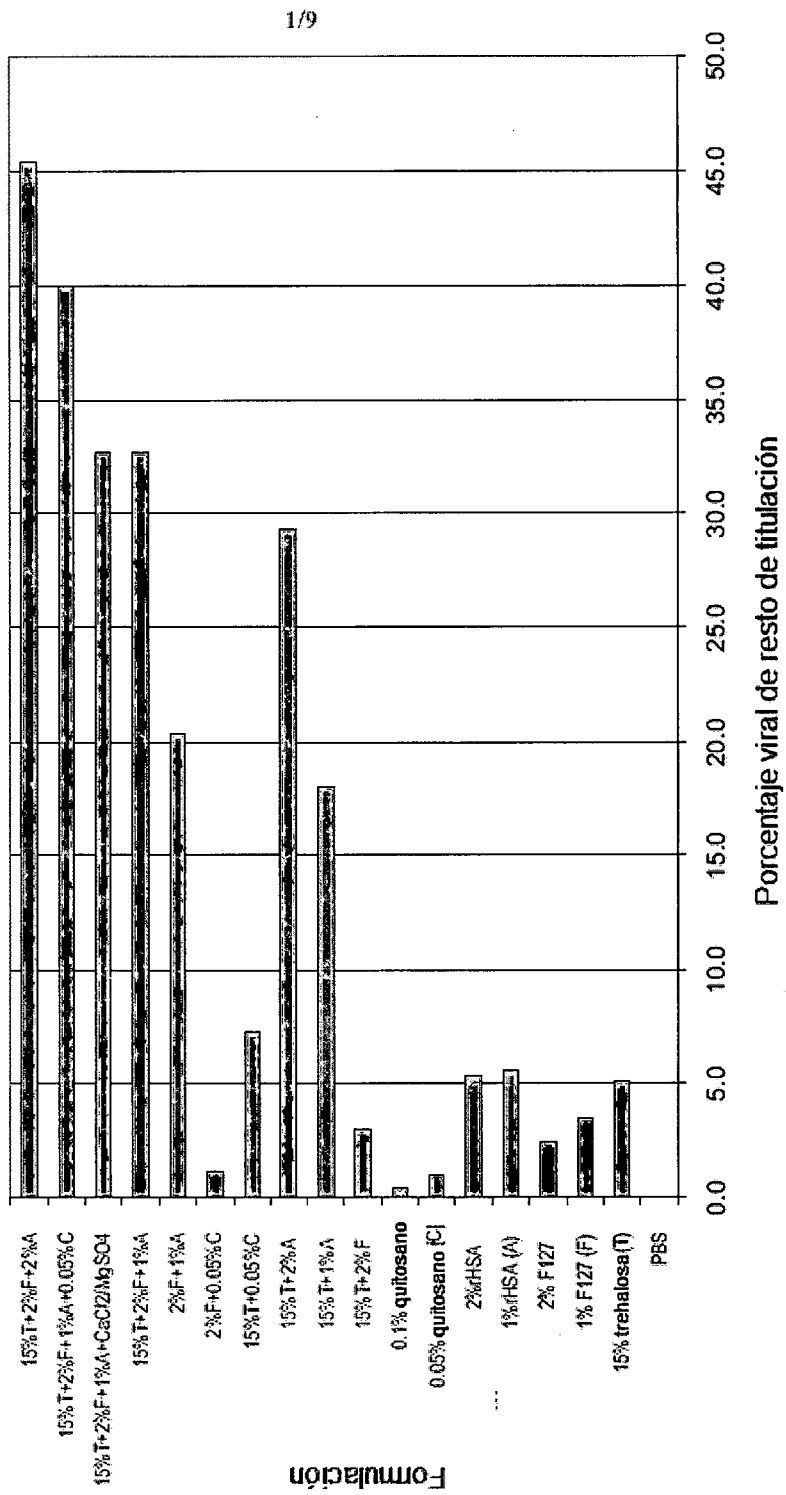


Fig. 2

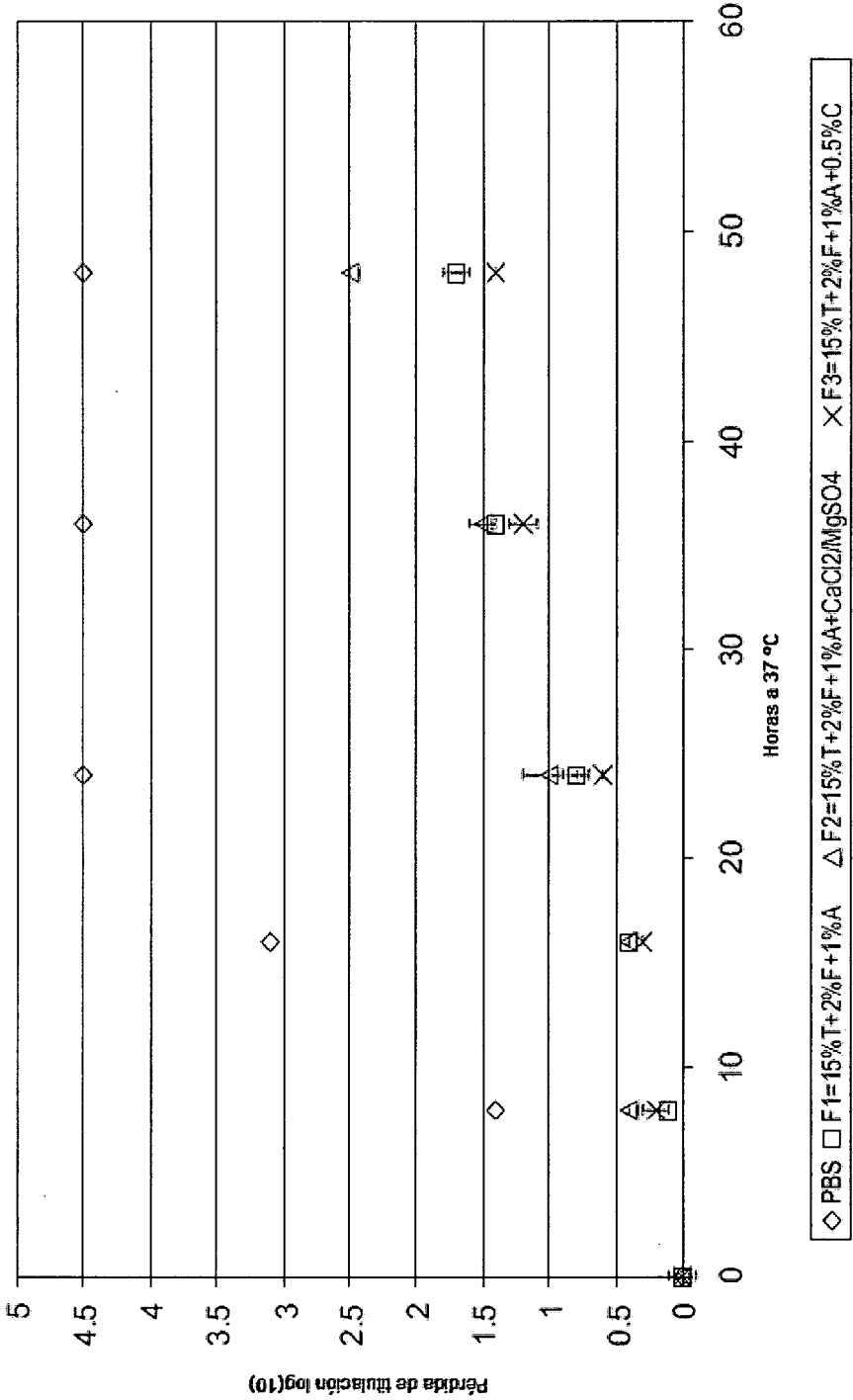
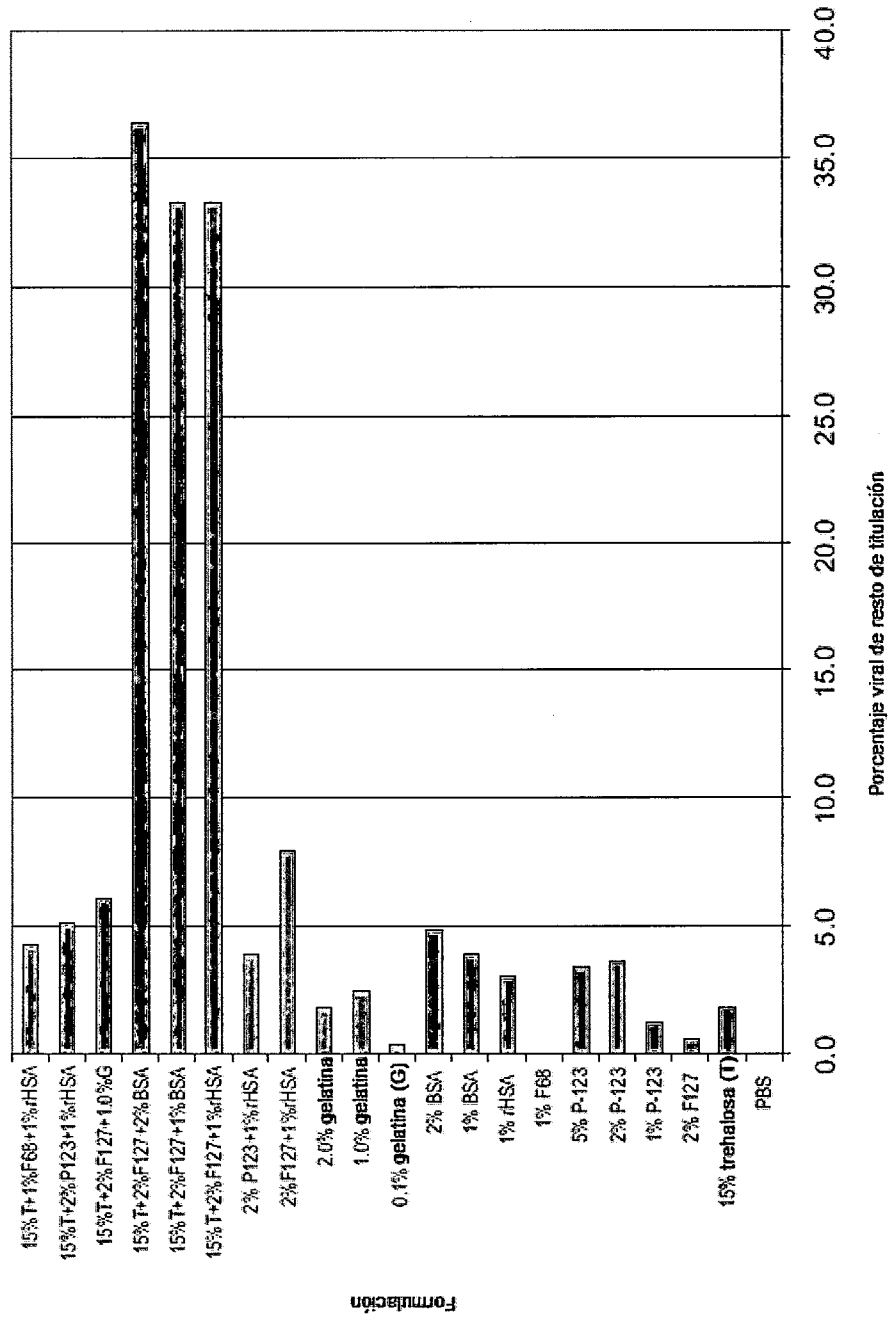


Fig.3



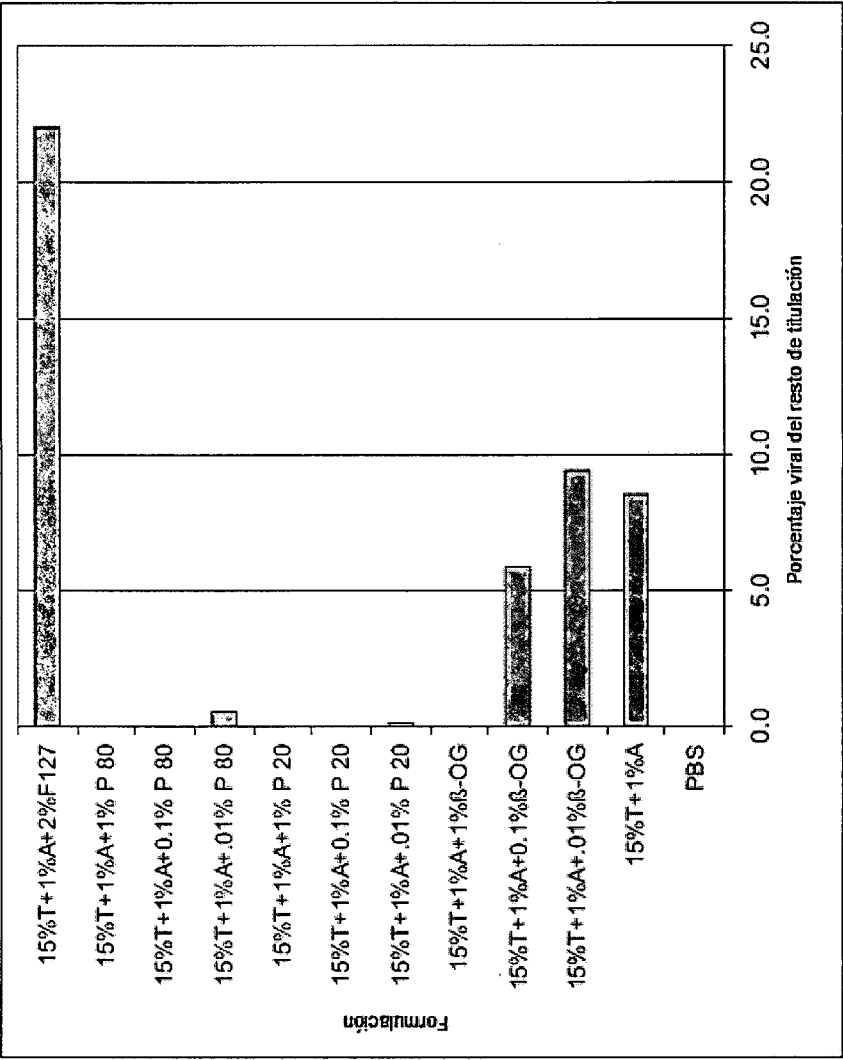


Fig. 4

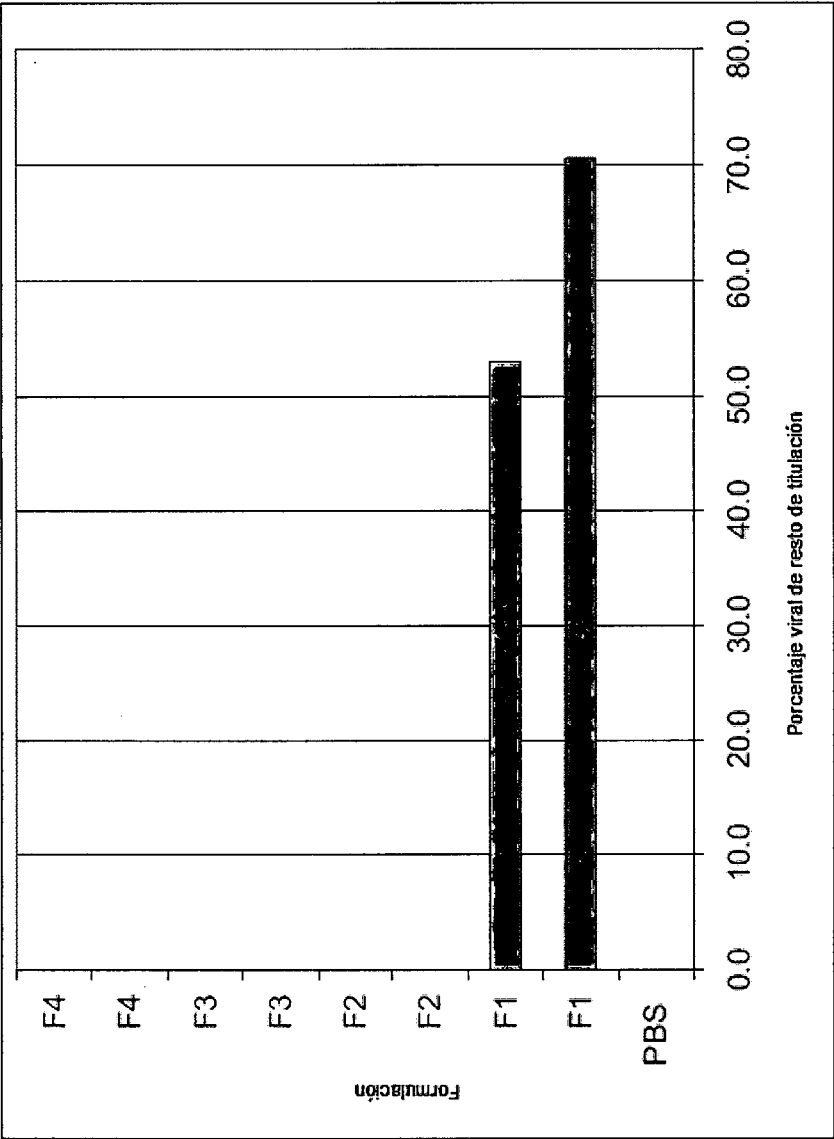
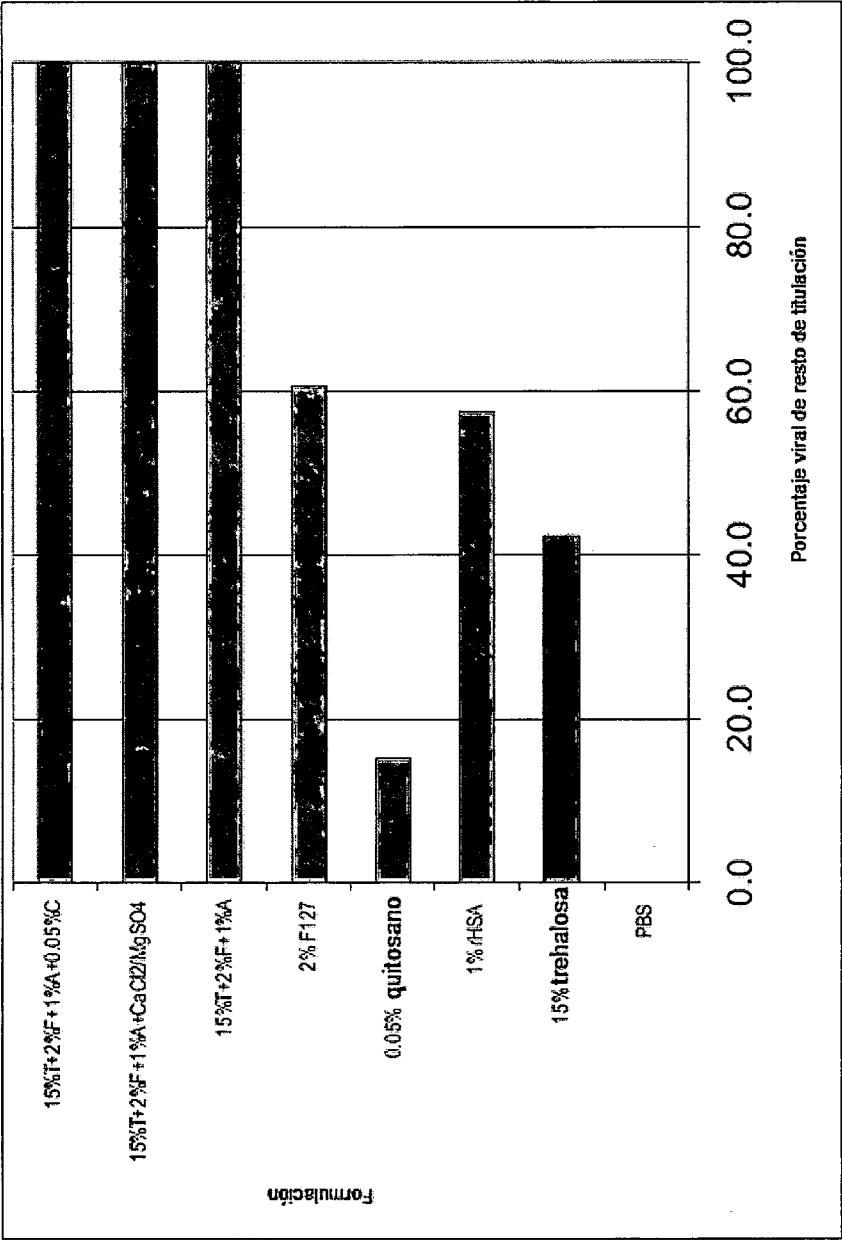
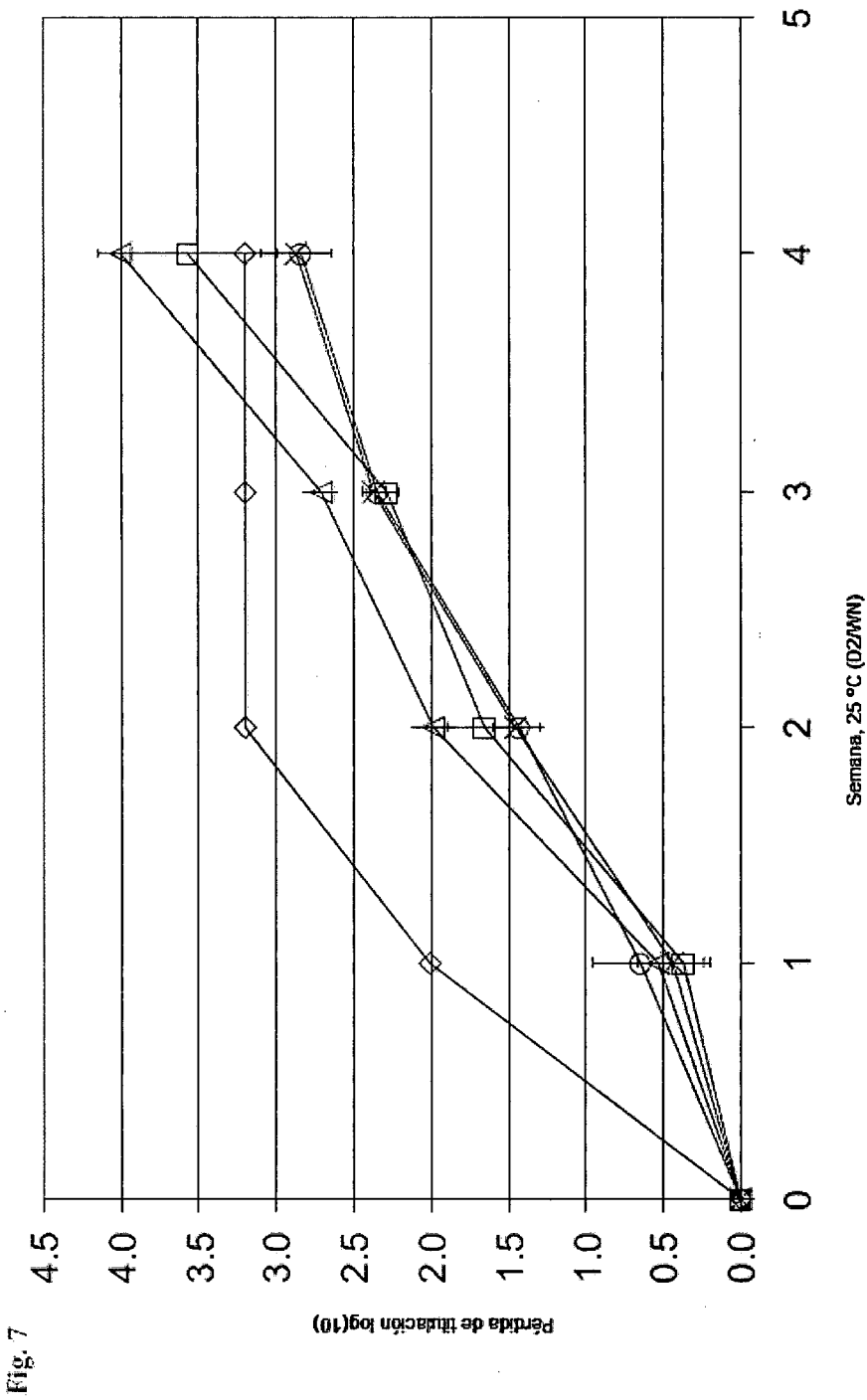


Fig. 5

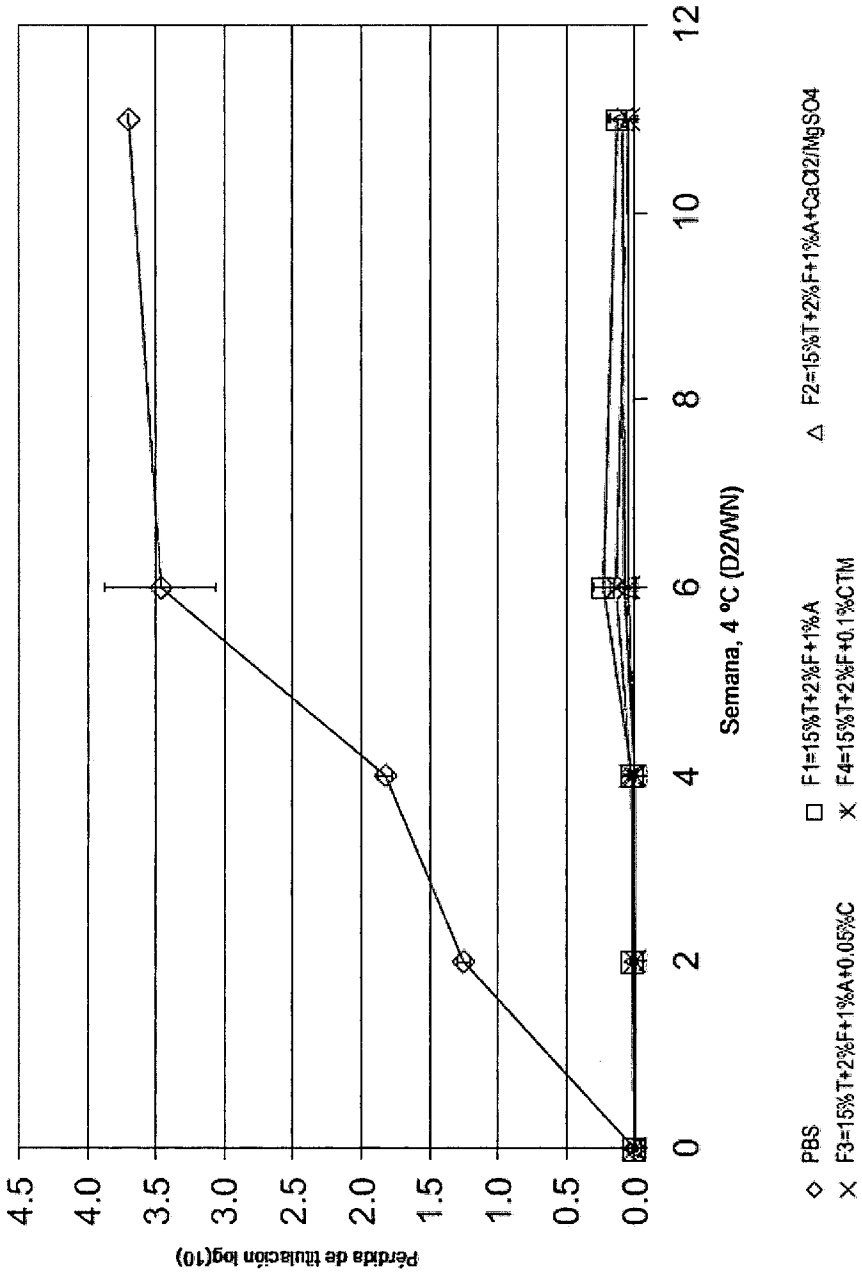
Fig. 6

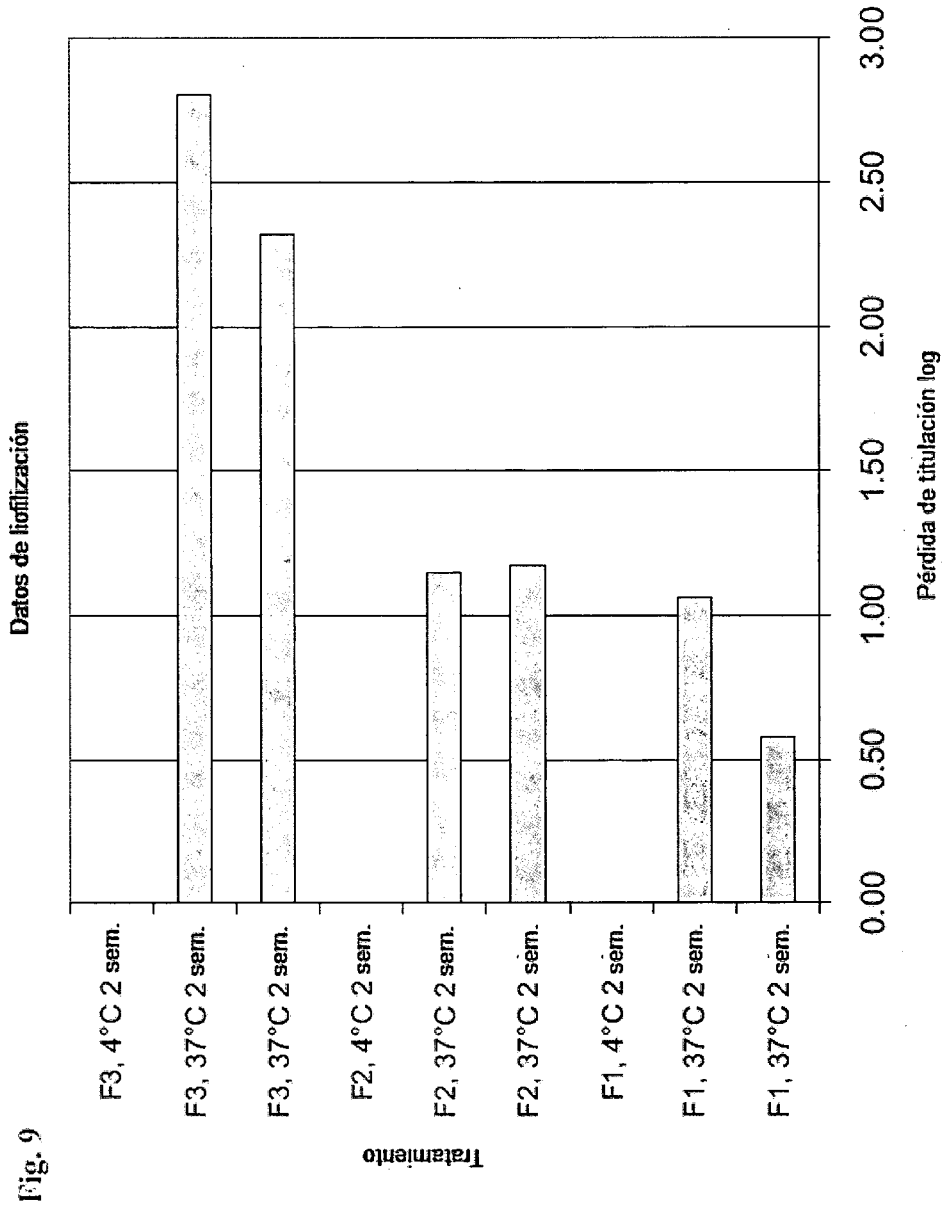




◇ PBS ○ F1=15%T+2%F+1%A △ F2=15%T+2%F+1%A+CaCl2/MgSO4 × F3=15%T+2%F+1%A+0.05%CTM □ F4=15%T+2%F+0.1%CTM

Fig. 8





CESIÓN

POR CUANTO nosotros, **Dan T. Stinchcomb**, ciudadano de los Estados Unidos, con residencia en 8409 County Road 3, Fort Collins, Colorado 80528, **Jorge E. Osorio**, ciudadano de los Estados Unidos con residencia en 560 Highway 78 South, Mount Orbe, Wisconsin 53572 y **O'Neil Wiggan**, ciudadano de Canadá residente en 1600 West Plum Street, Departamento 24E, Fort Collins, Colorado 80521, inventamos ciertos nuevos mejoramientos útiles tal como se describe a continuación.

Solicitud de patente provisoria de los Estados Unidos serie N.º 60/910.579, presentada el 6 de abril de 2007 intitulada **MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA VIRUS VIVOS;**

Solicitud de patente de los Estados Unidos N.º 12/098.077, presentada el 4 de abril de 2008 intitulada **MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA VIRUS VIVOS ATENUADOS;** y

Solicitud PCT N.º PCT/US2008/059472, presentada el 4 de abril de 2008 intitulada **MÉTODOS Y COMPOSICIONES PARA VIRUS VIVOS ATENUADOS.**

POR CUANTO Inviragen, Inc., una sociedad anónima de Delaware con domicilio en 2619 Midpoint Drive, Suite A, Fort Collins, Colorado 80525 desea adquirir la totalidad de los derechos, título e intereses en las invenciones, las solicitudes y cualquier Carta Patente o protección legal similar extranjera o local, que se obtenga en adelante;

EN CONSECUENCIA, por contraprestación válida y onerosa, cuyo recibo y adecuación se reconocen mediante la presente,

transferimos al Cesionario, sus sucesores y asignados la totalidad de nuestro derecho, título e interés sobre las invenciones, las solicitudes de patente identificadas con anterioridad, las correspondientes solicitudes locales (incluso provisionales, de división, continuaciones y continuaciones parciales), las correspondientes solicitudes extranjeras, todas las Cartas patente o protecciones legales similares emitidas sobre ellas, y todos los derechos y beneficios según cualquier tratado o convención aplicable; y autorizamos al Comisionado de Patentes y Marcas Comerciales de los Estados Unidos o su equivalente extranjero correspondiente a emitir la Carta patente o protección legal similar al Cesionario.

Autorizamos al Cesionario, sus sucesores y asignados, o cualquiera que este pueda designar adecuadamente, a solicitar las Cartas patente o protección legal similar, en su propio nombre si lo desea, en cualquier país extranjero.

Declaramos al Cesionario, sus sucesores y asignados que no hemos firmado ni firmaremos ningún escrito, ni realizaremos ninguna acción que esté en conflicto con la presente Cesión. Nosotros o nuestros ejecutores o administradores, en cualquier momento que nos sea requerido, sin contraprestación adicional, pero a costa del Cesionario, sus sucesores y asignados, firmaremos cualquier escrito adicional y realizaremos cualquier acción adicional que el Cesionario, sus sucesores y asignados consideren conveniente para perfeccionar el goce del presente otorgamiento, y brindaremos toda asistencia en la elaboración y la obtención, el mantenimiento y la ejecución

de las Cartas Patente o protección legal similar de las
invenciones en cualquier país.

[Hay una firma.]

Dan T. Stinchcomb

Fecha: 4/5/2009

CERTIFICADO DE RECONOCIMIENTO

ESTADO DE COLORADO

CONDADO DE LARIMOR

Firmado y jurado ante mí, Notaria Pública, el 4 de Mayo de
2009

[Hay una firma y un sello notarial.]

Kathy Winter

Notaria Pública

Estado de Colorado

Mi comisión vence el 18/7/2010

Expedientes N.º

78484 - 352448; 365433 y 365434

Página 1 de 2

CESIÓN

Jorge E. Osorio [En blanco.]

Fecha [En blanco.]

CERTIFICADO DE RECONOCIMIENTO

ESTADO DE [En blanco.]

CONDADO DE [En blanco.]

Firmado y jurado ante mí, Notaria Pública, el [En blanco]
de [En blanco.] 2008

Notaria Pública
(SELLO)

[Hay una firma.]
O'Neil Wiggan

Fecha 5/5/2009

CERTIFICADO DE RECONOCIMIENTO

ESTADO DE COLORADO
CONDADO DE LARIMER

Firmado y jurado ante mí, Notaria Pública, el 5 de Mayo de
2009

[Hay una firma y un sello notarial.]

Valerie J McIntyre
Notaria Pública
Estado de Colorado
Mi comisión vence el 16/8/2012

Expedientes N.º
78484 - 352448; 365433 y 365434

Página 2 de 2

CESIÓN

[Hay una firma.]

Jorge E. Osorio

Fecha 14/05/09

CERTIFICADO DE RECONOCIMIENTO

ESTADO DE WISCONSIN

CONDADO DE DANE

Firmado y jurado ante mí, Notario Público, el 14 de Mayo de
2009

[Hay una firma y un sello notarial.]

Notario Público

Estado de Wisconsin

O'Neil Wiggan [En blanco.]

Fecha: [En blanco.]

CERTIFICADO DE RECONOCIMIENTO

ESTADO DE [En blanco.]

CONDADO DE [En blanco.]

Firmado y jurado ante mí, Notario Público, el [En blanco]
de [En blanco.] 2008

Notario Público

(SELLO)

Expedientes N.º

78484 - 352448; 365433 y 365434

Página 2 de 2

ASSIGNMENT

WHEREAS, we, **Dan T. Stinchcomb**, a United States citizen, residing at 8409 County Road 3, Fort Collins, Colorado 80528, **Jorge E. Osorio**, a United States citizen, residing at 560 Highway 78 South, Mount Horeb, Wisconsin 53572, and **O'Neil Wiggan**, a Canadian citizen, residing at 1600 West Plum Street, Apartment 24E, Fort Collins, Colorado 80521, have invented certain new and useful improvements as described below:

U.S. Provisional Patent Application Serial No. 60/910,579, filed on April 6, 2007 entitled **METHODS AND COMPOSITIONS FOR LIVE VIRUSES**;

U.S. Patent Application No. 12/098,077 filed April 4, 2008 entitled **METHODS AND COMPOSITIONS FOR LIVE ATTENUATED VIRUSES**; and

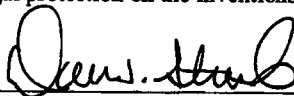
PCT Application No. PCT/US2008/059472, filed April 4, 2008 entitled **METHODS AND COMPOSITIONS FOR LIVE ATTENUATED VIRUSES**.

WHEREAS, Inviragen, Inc., a Delaware corporation, having an address of 2619 Midpoint Drive, Suite A, Fort Collins, Colorado 80525, is desirous of acquiring the entire right, title and interest in and to the inventions, the applications, and any and all Letters Patent or similar legal protection, foreign or domestic, to be obtained therefor;

NOW, THEREFORE, for good and valuable consideration, the receipt and adequacy of which are hereby acknowledged, we transfer to Assignee, its successors and assigns, our entire right, title, and interest in and to the inventions, the above-identified patent applications, corresponding domestic applications (including provisionals, divisionals, continuations, and continuations-in-part), corresponding foreign applications, all Letters Patent or similar legal protection issuing thereon, and all rights and benefits under any applicable treaty or convention; and we authorize the Commissioner of Patents and Trademarks of the United States or foreign equivalent thereof to issue the Letters Patent or similar legal protection to the Assignee.

We authorize the Assignee, its successors and assigns, or anyone it may properly designate, to apply for Letters Patent or similar legal protection, in its own name if desired, in any and all foreign countries.

We represent to the Assignee, its successors and assigns, that we have not and shall not execute any writing or do any act whatsoever conflicting with this Assignment. We, or our executors or administrators, will at any time upon request, without additional consideration, but at the expense of the Assignee, its successors and assigns, execute such additional writings and do such additional acts as the Assignee, its successors and assigns, may deem desirable to perfect its enjoyment of this grant, and render all assistance in making application for and obtaining, maintaining, and enforcing the Letters Patent or similar legal protection on the inventions in any and all countries.



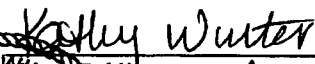
Dan T. Stinchcomb

Date 5/4/2007

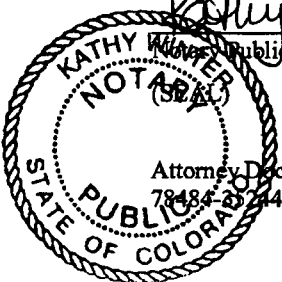
CERTIFICATE OF ACKNOWLEDGMENT

STATE OF Colorado)
COUNTY OF Larimer) SS.

Subscribed and sworn to before me, a Notary Public,
this 4th day of May, 2008: 9



my commission expires 7-18-2010



Attorney Docket Nos:
78484-252448; 365433 and 365434

ASSIGNMENT

Jorge E. Osorio

Date _____

CERTIFICATE OF ACKNOWLEDGMENT

STATE OF _____)
: SS.
COUNTY OF _____)

Subscribed and sworn to before me, a Notary Public,
this _____ day of _____, 2008.

Notary Public

(SEAL)

Neil Wiggan
O'Neil Wiggan

Date 5/5/2009

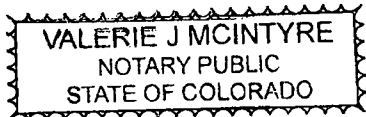
CERTIFICATE OF ACKNOWLEDGMENT

STATE OF Colorado)
: SS.
COUNTY OF Larimer)

Subscribed and sworn to before me, a Notary Public,
this 5 day of May, 2008. 2009 vdr

Valerie J McIntyre
Notary Public

(SEAL)



Commission
expires 8/16/12

ASSIGNMENT

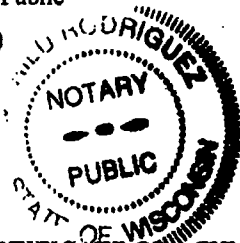
Jorge E. Osorio
Jorge E. Osorio
Date 05/14/09

CERTIFICATE OF ACKNOWLEDGMENT

STATE OF Wisconsin
COUNTY OF Dane : SS.

Subscribed and sworn to before me, a Notary Public,
this 14th day of May, 2008.

[Signature]
Notary Public
(SEAL)



O'Neil Wiggan
O'Neil Wiggan
Date _____

CERTIFICATE OF ACKNOWLEDGMENT

STATE OF _____)
COUNTY OF _____) : SS.

Subscribed and sworn to before me, a Notary Public,
this _____ day of _____, 2008.

Notary Public
(SEAL)

PCT REQUESTOriginal (for **SUBMISSION**)

0	For receiving Office use only	
0-1	International Application No.	
0-2	International Filing Date	
0-3	Name of receiving Office and "PCT International Application"	
0-4	Form PCT/RO/101 PCT Request	
0-4-1	Prepared Using	PCT-SAFE [EASY mode] Version 3.51.028.203 MT/FOP 20080401/0.20.5.12
0-5	Petition The undersigned requests that the present international application be processed according to the Patent Cooperation Treaty	
0-6	Receiving Office (specified by the applicant)	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (RO/US)
0-7	Applicant's or agent's file reference	78484-365434
I	Title of Invention	METHODS AND COMPOSITIONS FOR LIVE ATTENUATED VIRUSES
II	Applicant	
II-1	This person is	applicant only
II-2	Applicant for	all designated States except US
II-4	Name	INVIRAGEN, INC.
II-5	Address	2619 Midpoint Drive Suite A Fort Collins, Colorado 80525 United States of America
II-6	State of nationality	US
II-7	State of residence	US
III-1	Applicant and/or inventor	
III-1-1	This person is	applicant and inventor
III-1-2	Applicant for	US only
III-1-4	Name (LAST, First)	STINCHCOMB, Dan T.
III-1-5	Address	8409 County Road 3 Fort Collins, Colorado 80528 United States of America
III-1-6	State of nationality	US
III-1-7	State of residence	US

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

III-2	Applicant and/or inventor	
III-2-1	This person is	applicant and inventor
III-2-2	Applicant for	US only
III-2-4	Name (LAST, First)	OSORIO, Jorge E.
III-2-5	Address	560 Highway 78 South Mount Horeb, Wisconsin 53572 United States of America
III-2-6	State of nationality	US
III-2-7	State of residence	US
III-3	Applicant and/or inventor	
III-3-1	This person is	applicant and inventor
III-3-2	Applicant for	US only
III-3-4	Name (LAST, First)	WIGGAN, O'Neil
III-3-5	Address	1600 West Plum Street Fort Collins, Colorado 80521 United States of America
III-3-6	State of nationality	CA
III-3-7	State of residence	US
IV-1	Agent or common representative; or address for correspondence The person identified below is hereby/ has been appointed to act on behalf of the applicant(s) before the competent International Authorities as:	agent
IV-1-1	Name (LAST, First)	HANSON, Roberta Jean
IV-1-2	Address	FAEGRE & BENSON LLP 2200 Wells Fargo Center 90 South Seventh Street Minneapolis, Minnesota 55402 United States of America
IV-1-3	Telephone No.	(303) 607-3500
IV-1-4	Facsimile No.	(303) 607-3600
IV-1-5	e-mail	bhanson@faegre.com
IV-1-6	Agent's registration No.	51774
V	DESIGNATIONS	
V-1	The filing of this request constitutes under Rule 4.9(a), the designation of all Contracting States bound by the PCT on the international filing date, for the grant of every kind of protection available and, where applicable, for the grant of both regional and national patents.	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

VI-1	Priority claim of earlier national application		
VI-1-1	Filing date	06 April 2007 (06.04.2007)	
VI-1-2	Number	60/910,579	
VI-1-3	Country	US	
VI-2	Priority document request		
	The receiving Office is requested to prepare and transmit to the International Bureau a certified copy of the earlier application(s) identified above as item(s):	VI-1	
VI-3	Incorporation by reference :		
	where an element of the international application referred to in Article 11(1)(iii)(d) or (e) or a part of the description, claims or drawings referred to in Rule 20.5(a) is not otherwise contained in this international application but is completely contained in an earlier application whose priority is claimed on the date on which one or more elements referred to in Article 11(1)(iii) were first received by the receiving Office, that element or part is, subject to confirmation under Rule 20.6, incorporated by reference in this international application for the purposes of Rule 20.6.		
VII-1	International Searching Authority Chosen	United States Patent and Trademark Office (USPTO) (ISA/US)	
VIII	Declarations	Number of declarations	
VIII-1	Declaration as to the identity of the inventor	-	
VIII-2	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to apply for and be granted a patent	-	
VIII-3	Declaration as to the applicant's entitlement, as at the international filing date, to claim the priority of the earlier application	-	
VIII-4	Declaration of inventorship (only for the purposes of the designation of the United States of America)	-	
VIII-5	Declaration as to non-prejudicial disclosures or exceptions to lack of novelty	-	

PCT REQUEST

Original (for SUBMISSION)

IX	Check list	number of sheets	electronic file(s) attached
IX-1	Request (including declaration sheets)	4	✓
IX-2	Description	32	-
IX-3	Claims	4	-
IX-4	Abstract	1	✓
IX-5	Drawings	9	-
IX-7	TOTAL	50	
	Accompanying Items	paper document(s) attached	electronic file(s) attached
IX-8	Fee calculation sheet	✓	-
IX-17	PCT-SAFE physical media	-	✓
IX-19	Figure of the drawings which should accompany the abstract	1	
IX-20	Language of filing of the international application	English	
X-1	Signature of applicant, agent or common representative	/Roberta Jean Hanson #51,774/	
X-1-1	Name (LAST, First)	HANSON, Roberta Jean	
X-1-2	Name of signatory		
X-1-3	Capacity		

FOR RECEIVING OFFICE USE ONLY

10-1	Date of actual receipt of the purported international application	
10-2	Drawings:	
10-2-1	Received	
10-2-2	Not received	
10-3	Corrected date of actual receipt due to later but timely received papers or drawings completing the purported international application	
10-4	Date of timely receipt of the required corrections under PCT Article 11(2)	
10-5	International Searching Authority	ISA/US
10-6	Transmittal of search copy delayed until search fee is paid	

FOR INTERNATIONAL BUREAU USE ONLY

11-1	Date of receipt of the record copy by the International Bureau	
------	--	--

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
29 January 2009 (29.01.2009)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2009/014774 A1

(51) International Patent Classification:
C12N 7/04 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/US2008/059472

(22) International Filing Date: 4 April 2008 (04.04.2008)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/910,579 6 April 2007 (06.04.2007) US

(71) Applicant (for all designated States except US): INVIRAGEN, INC. [US/US]; 2619 Midpoint Drive, Suite A, Fort Collins, Colorado 80525 (US).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (for US only): STINCHCOMB, Dan T. [US/US]; 8409 County Road 3, Fort Collins, Colorado 80528 (US). OSORIO, Jorge E. [US/US]; 560 Highway 78 South, Mount Horeb, Wisconsin 53572 (US). WIGGAN, O'Neil [CA/US]; 1600 West Plum Street, Fort Collins, Colorado 80521 (US).

(74) Agent: HANSON, Roberta Jean; Faegre & Benson LLP, 2200 Wells Fargo Center 90 South Seventh Street, Minneapolis, Minnesota 55402 (US).

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

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

Published:

- with international search report
- before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments

(54) Title: METHODS AND COMPOSITIONS FOR LIVE ATTENUATED VIRUSES

(57) Abstract: One or more live, attenuated viruses and compositions to reduce inactivation and/or degradation of the live, attenuated virus, including a vaccine are disclosed. This composition may include at least one carbohydrate, at least one protein and at least one high molecular weight surfactant.

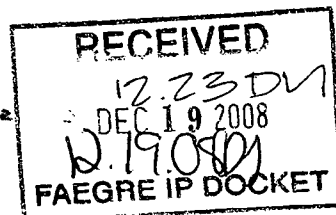
WO 2009/014774 A1

DOCKETED

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

RSH
PCT



To:
ROBERTA JEAN HANSON
FAEGRE & BENSON LLP
2200 WELLS FARGO CENTER
90 SOUTH SEVENTH STREET
MINNEAPOLIS, MN 55402

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing (day/month/year)	
Applicant's or agent's file reference 78484-365434 ✓	FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below
International application No. PCT/US 08/59472 ✓	International filing date (day/month/year) 04 April 2008 (04.04.2008)
Applicant INVIRAGEN, INC	
Amend Claims Article 19 - 2/16/09	

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 740 14 35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.
3. ☐ With regard to the protest against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:
- ☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.
- ☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US Mail Stop PCT, Attn: ISA/US Commissioner for Patents P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450 Facsimile No. 571-273-3201	Authorized officer: Lee W. Young PCT Helpdesk: 571-272-4300 PCT OSP: 571-272-7774
---	--

PATENT COOPERATION TREATY

From the INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

To:
ROBERTA JEAN HANSON
FAEGRE & BENSON LLP
2200 WELLS FARGO CENTER
90 SOUTH SEVENTH STREET
MINNEAPOLIS, MN 55402

NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF
THE INTERNATIONAL SEARCH REPORT AND
THE WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL
SEARCHING AUTHORITY, OR THE DECLARATION

(PCT Rule 44.1)

Date of mailing
(day/month/year) **16 DEC 2008**

Applicant's or agent's file reference
78484-365434

FOR FURTHER ACTION See paragraphs 1 and 4 below

International application No.
PCT/US 08/59472

International filing date
(day/month/year) **04 April 2008 (04.04.2008)**

Applicant **INVIRAGEN, INC**

1. ☒ The applicant is hereby notified that the international search report and the written opinion of the International Searching Authority have been established and are transmitted herewith.

Filing of amendments and statement under Article 19:

The applicant is entitled, if he so wishes, to amend the claims of the international application (see Rule 46):

When? The time limit for filing such amendments is normally two months from the date of transmittal of the international search report.

Where? Directly to the International Bureau of WIPO, 34 chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland, Facsimile No.: +41 22 740 14 35

For more detailed instructions, see the notes on the accompanying sheet.

2. ☐ The applicant is hereby notified that no international search report will be established and that the declaration under Article 17(2)(a) to that effect and the written opinion of the International Searching Authority are transmitted herewith.

3. ☐ **With regard to the protest** against payment of (an) additional fee(s) under Rule 40.2, the applicant is notified that:

☐ the protest together with the decision thereon has been transmitted to the International Bureau together with the applicant's request to forward the texts of both the protest and the decision thereon to the designated Offices.

☐ no decision has been made yet on the protest; the applicant will be notified as soon as a decision is made.

4. **Reminders**

Shortly after the expiration of **18 months** from the priority date, the international application will be published by the International Bureau. If the applicant wishes to avoid or postpone publication, a notice of withdrawal of the international application, or of the priority claim, must reach the International Bureau as provided in Rules 90bis.1 and 90bis.3, respectively, before the completion of the technical preparations for international publication.

The applicant may submit comments on an informal basis on the written opinion of the International Searching Authority to the International Bureau. The International Bureau will send a copy of such comments to all designated Offices unless an international preliminary examination report has been or is to be established. These comments would also be made available to the public but not before the expiration of 30 months from the priority date.

Within **19 months** from the priority date, but only in respect of some designated Offices, a demand for international preliminary examination must be filed if the applicant wishes to postpone the entry into the national phase **until 30 months** from the priority date (in some Offices even later); otherwise, the applicant must, **within 20 months** from the priority date, perform the prescribed acts for entry into the national phase before those designated Offices.

In respect of other designated Offices, the time limit of **30 months** (or later) will apply even if no demand is filed within 19 months.

See the Annex to Form PCT/IB/301 and, for details about the applicable time limits, Office by Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters and the WIPO Internet site.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

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

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference 78484-365434	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/US 08/59472	International filing date (day/month/year) 04 April 2008 (04.04.2008)	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 06 April 2007 (06.04.2007)
Applicant INVIRAGEN, INC <i>Cite Search Report - 3/16/09</i>		

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

This international search report consists of a total of 3 sheets.

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

1. Basis of the report

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

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

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

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

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

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

4. With regard to the **title**,

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

5. With regard to the **abstract**,

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

6. With regard to the **drawings**,

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/59472

Box No. IV Text of the abstract (Continuation of item 5 of the first sheet)

One or more live, attenuated viruses and compositions to reduce inactivation and/or degradation of the live, attenuated virus, including a vaccine are disclosed. This composition may include at least one carbohydrate, at least one protein and at least one high molecular weight surfactant.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/59472

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12N 7/04 (2008.04)

USPC - 435/236

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

USPC- 435/236

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

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

PubWEST, Google Scholar

Search Terms: attenuated virus, surfactant, molecular weight, carbohydrate, sugar, flavivirus, pluronic F127, trehalose, serum albumin, lactalbumin, fetoprotein, bitamin D binding protein, sorbitol, chitosan, mannitol, sucrose, togavirus, coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/0255121 A1 (CAMPBELL et al.), 17 Nov 2005 (17.11.2005), para [0029], [0030], [0037], [0078], [0103], [0107], [0115], [0135], [0140], [0141], [0146], [0147], [0160], [0177], [0193], [0223], [0225], [0317], [0323]	1-32
A	US 2005/0276785 A1 (GROETZBACH et al.), 15 Dec. 2005 (15.12.2005), para [0180]	1-32

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 Dec. 2008 (08.12.2008)

Date of mailing of the international search report

16 DEC 2008

Name and mailing address of the ISA/US

Mail Stop PCT, Attn: ISA/US, Commissioner for Patents

P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43bis.1)

To: ROBERTA JEAN HANSON
FAEGRE & BENSON LLP
2200 WELLS FARGO CENTER
90 SOUTH SEVENTH STREET
MINNEAPOLIS, MN 55402

Date of mailing
(day/month/year) 16 DEC 2008

Applicant's or agent's file reference
78484-365434

FOR FURTHER ACTION

See paragraph 2 below

International application No.

PCT/US 08/59472

International filing date (day/month/year)

04 April 2008 (04.04.2008)

Priority date (day/month/year)

06 April 2007 (06.04.2007)

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

IPC(8) - C12N 7/04 (2008.04)

USPC - 435/236

Applicant INVIRAGEN, INC

Response to Written Opinion 3/16/09

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☐ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☐ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. FURTHER ACTION

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA/US
Mail Stop PCT, Attn: ISA/US
Commissioner for Patents
P.O. Box 1450, Alexandria, Virginia 22313-1450
Facsimile No. 571-273-3201

Date of completion of this opinion

08 Dec. 2008 (08.12.2008)

Authorized officer:

Lee W. Young

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

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 08/59472

Box No. I. Basis of this opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

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

2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))

3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of:

a. type of material

- ☐ a sequence listing
☐ table(s) related to the sequence listing

b. format of material

- ☐ on paper
☐ in electronic form

c. time of filing/furnishing

- ☐ contained in the international application as filed
☐ filed together with the international application in electronic form
☐ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

5. Additional comments:

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.

PCT/US 08/59472

Box No. V Reasoned statement under Rule 43bis.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Claims	21, 22	YES
	Claims	1-20 and 23-32	NO
Inventive step (IS)	Claims	None	YES
	Claims	1-32	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-32	YES
	Claims	None	NO

2. Citations and explanations:

Claims 1- 20 and 23-32 lack novelty under PCT Article 33(2) as being anticipated by US 2005/0255121 A1 to Campbell et al. (hereinafter 'Campbell').

As per claim 1, Campbell teaches a live attenuated virus composition (para [0193]) comprising:

one or more live, attenuated viruses (para [0193]);

one or more high molecular weight surfactants (para [0029], [0135], [0140], [0146]- pluronic F127);

one or more protein agents (para [0177]), and

one or more carbohydrate agents (para [0225]) wherein the composition is capable of reducing the inactivation of the live attenuated virus (para [0160]- facilitate or maintain growth of immunogen; [0029]- vehicles and ingredients for growth medium).

As per claims 2 and 3, Campbell discloses the virus composition of claim 1, wherein the live, attenuated viruses are Flaviviruses (para [0030]).

As per claim 4, Campbell discloses the virus composition of claim 1, wherein the composition is in aqueous form (para [0107], [0136]).

As per claim 5, Campbell discloses the virus composition of claim 1, wherein the composition is partially or wholly dehydrated (para [0115] - dry lyophilized powder).

As per claim 6, Campbell discloses the virus composition of claim 1, wherein the surfactant agent has a molecular weight of 1500 or greater (para [0141]).

As per claim 7, Campbell discloses the virus composition of claim 1, wherein the surfactant agent(s) further comprises one or more copolymers wherein the molecular weight of the surfactant agent is 3000 or greater (para [0141]).

As per claim 8, Campbell discloses the virus composition of claim 1, wherein the surfactant agent(s) consists of one or more EO-PO block copolymers (para [0135], [0146]- pluronic F127).

As per claim 9, Campbell discloses the virus composition of claim 1, wherein the protein agent(s) are selected from the group consisting of lactalbumin, serum albumin, alpha-fetoprotein, vitamin D binding protein, afamin derived from a vertebrate species and a combination thereof (para [0029]).

As per claim 10, Campbell discloses the virus composition of claim 1, wherein the protein agent(s) is serum albumin derived from a vertebrate species (para [0029]- human serum albumin).

As per claim 11, Campbell discloses the virus composition of claim 1, wherein the carbohydrate agent(s) is at least one of a saccharide, a polyol or a combination thereof (para [0223]).

As per claim 12, Campbell discloses the virus composition of claim 1, wherein one or more of the carbohydrate agent(s) is selected from the group consisting of trehalose, sucrose, chitosan, sorbitol, mannitol and a combination thereof (para [0225]).

As per claim 13, Campbell discloses the virus composition of claim 1, wherein the carbohydrate agent is trehalose (para [0225]).

As per claim 14, Campbell discloses the virus composition of claim 1, wherein at least one surfactant agent is the EO-PO block copolymer Pluronic F127 (para [0135], [0146]-[0147]), at least one protein agent is serum albumin (para [0029]), and at least one carbohydrate agent is trehalose (para [0225]).

As per claim 15, Campbell discloses the virus composition of claim 14, wherein the EO-PO block copolymer Pluronic F127 concentration is from 0.1 to 4% (w/v) (para [0078]), wherein the serum albumin concentration is from 0.001 to 3% (w/v) (para [0103]- concentration of the excipient can be from 0.1% to at least 5%) and the trehalose concentration is from 5 to 50% (w/v) (para [0103]- concentration of the excipient can be 0.000002% to 58%) .

-----Continued in Supplemental Box-----

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.

PCT/US 08/59472

Supplemental Box

In case the space in any of the preceding boxes is not sufficient.

Continuation of:
Box V(2)-

As per claim 16, Campbell discloses a method for decreasing inactivation of a live, attenuated virus composition comprising, combining one or more live attenuated viruses (para [0193]) with a composition comprising one or more high molecular weight surfactants (para [0029], [0135], [0140], [0146]- pluronic F127), one or more protein agents (para [0177]), and one or more carbohydrates (para [0223], [0225]) wherein the composition is capable of reducing inactivation of the live, attenuated virus (para [0160]- facilitate or maintain growth of immunogen; [0029]- vehicles and ingredients for growth medium).

As per claim 17, Campbell discloses the method of claim 16, wherein the live, attenuated viruses are selected from the group consisting of Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Herpesvirus, Poxvirus families and combinations thereof (para [0030]).

As per claim 18, Campbell discloses the method of claim 16, further comprising partially or wholly dehydrating the combination (para [0115]- dry lyophilized powder).

As per claim 19, Campbell discloses the method of claim 18, further comprising partially or wholly re-hydrating the composition prior to administration (para [0115]).

As per claim 20, Campbell discloses the method of claim 16, wherein the composition increases the shelf life of an aqueous virus composition (para [0160]- facilitate or maintain growth of immunogen; [0029]- vehicles and ingredients for growth medium).

As per claim 23, Campbell discloses the method of claim 16, wherein at least one high molecular weight surfactants is an EO-PO block copolymer Pluronic F127 (para [0135], [0146]-[0147]), at least one of the protein agents is serum albumin (para [0029]), and at least one of the carbohydrate agents is trehalose (para [0225]).

As per claim 24, Campbell discloses the method of claim 16, wherein the virus composition is administered to a subject to reduce the onset of or prevent a health condition (para [0317]).

As per claim 25, Campbell discloses the method of claim 24, wherein the health condition is selected from the group consisting of West Nile infection, Dengue fever, Japanese encephalitis, Kyasanur Forest disease, Murray Valley encephalitis, St. Louis encephalitis, Tick-borne encephalitis, Yellow fever and Hepatitis C Virus Infection (para [0323]).

As per claim 26, Campbell discloses a kit (para [0037]) for decreasing the inactivation of a live, attenuated virus composition comprising: at least one container (para [0115]- hermetically sealed container); and a composition comprising one or more protein agents (para [0029]), one or more carbohydrate agents (para [0223], [0225]), and one or more high molecular weight surfactants (para [0029], [0135], [0140], [0146]- pluronic F127), wherein the composition decreases inactivation of a live, attenuated virus (para [0160]- facilitate or maintain growth of immunogen; [0029]- vehicles and ingredients for growth medium).

As per claim 27, Campbell discloses the kit of claim 26, wherein at least one surfactant agent is an EO-PO block copolymer Pluronic F127 (para [0135], [0146]-[0147]), at least one protein agent is serum albumin (para [0029]), and at least one carbohydrate agent is trehalose (para [0225]).

As per claim 28, Campbell discloses the kit of claim 27, wherein the trehalose concentration is from 5 to 50% (w/v) (para [0103]- concentration of the excipient can be 0.000002% to 58%; para [0225]).

As per claim 29, Campbell discloses the kit of claim 27, wherein the EO-PO block copolymer Pluronic F127 concentration is from 0.1 to 4% (w/v) (para [0078]).

As per claim 30, Campbell discloses the kit of claim 27, wherein the serum albumin concentration is from 0.001 to 3% (w/v) (para [0029], para [0103]- concentration of the excipient can be 0.000002% to 58%; para [0225]).

As per claim 31, Campbell discloses the kit of claim 26, wherein the composition further comprises one or more live, attenuated viruses (para [0193]).

As per claim 32, Campbell discloses the kit of claim 31, wherein the live, attenuated viruses are selected from the group consisting of Flavivirus, Togavirus, Coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus, Paramyxovirus, Orthomyxovirus, Bunyavirus, Arenavirus, Retrovirus, Hepadnavirus, Herpesvirus, Poxvirus families and combinations thereof (para [0030]).

Claims 21 and 22 lack an inventive step under PCT Article 33(3) as being obvious over Campbell.

As per claims 21 and 22, Campbell discloses the method of claim 16, wherein the composition increases the shelf life of an aqueous virus composition (para [0160]- facilitate or maintain growth of immunogen; [0029]- vehicles and ingredients for growth medium), but fails to specifically teach the composition decreases inactivation of an aqueous live, attenuated virus for 24 hours or greater, or during one or more freeze and thaw cycles. However, Campbell teaches all the constituents of the composition and thus it would have been obvious to one skilled in the art to ascertain through routine experimentation the exact quantities of each excipient to include in the composition to achieve the claimed characteristics.

Claims 1-32 have industrial applicability as defined by PCT Article 33(4) because the subject matter can be made or used in industry.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220

These Notes are intended to give the basic instructions concerning the filing of amendments under Article 19. The Notes are based on the requirements of the Patent Cooperation Treaty, the Regulations and the Administrative Instructions under that Treaty. In case of discrepancy between these Notes and those requirements, the latter are applicable. For more detailed information, see also the *PCT Applicant's Guide*, a publication of WIPO.

In these Notes, "Article," "Rule" and "Section" refer to the provisions of the PCT, the PCT Regulations and the PCT Administrative Instructions, respectively.

INSTRUCTIONS CONCERNING AMENDMENTS UNDER ARTICLE 19

The applicant has, after having received the international search report and the written opinion of the International Searching Authority, one opportunity to amend the claims of the international application. It should however be emphasized that, since all parts of the international application (claims, description and drawings) may be amended during the international preliminary examination procedure, there is usually no need to file amendments of the claims under Article 19 except where, e.g. the applicant wants the latter to be published for the purposes of provisional protection or has another reason for amending the claims before international publication. Furthermore, it should be emphasized that provisional protection is available in some States only (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, Annexes B1 and B2).

The attention of the applicant is drawn to the fact that amendments to the claims under Article 19 are not allowed where the International Searching Authority has declared, under Article 17(2), that no international search report would be established (see *PCT Applicant's Guide*, Volume I/A, paragraph 296).

What parts of the international application may be amended ?

Under Article 19, only the claims may be amended.

During the international phase, the claims may also be amended (or further amended) under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority. The description and drawings may only be amended under Article 34 before the International Preliminary Examining Authority.

Upon entry into the national phase, all parts of the international application may be amended under Article 28 or, where applicable, Article 41.

When ? Within 2 months from the date of transmittal of the international search report or 16 months from the priority date, whichever time limit expires later. It should be noted, however, that the amendments will be considered as having been received on time if they are received by the International Bureau after the expiration of the applicable time limit but before the completion of the technical preparations for international publication (Rule 46.1).

Where not to file the amendments ?

The amendments may only be filed with the International Bureau and not with the receiving Office or the International Searching Authority (Rule 46.2).

Where a demand for international preliminary examination has been/is filed, see below.

How ? Either by cancelling one or more entire claims, by adding one or more new claims or by amending the text of one or more of the claims as filed.

A replacement sheet must be submitted for each sheet of the claims which, on account of an amendment or amendments, differs from the sheet originally filed.

All the claims appearing on a replacement sheet must be numbered in Arabic numerals. Where a claim is cancelled, no renumbering of the other claims is required. In all cases where claims are renumbered, they must be renumbered consecutively (Section 205(b)).

The amendments must be made in the language in which the international application is to be published.

What documents must/may accompany the amendments ?

Letter (Section 205(b)):

The amendments must be submitted with a letter.

The letter will not be published with the international application and the amended claims. It should not be confused with the "Statement under Article 19(1)" (see below, under "Statement under Article 19(1)").

The letter must be in English or French, at the choice of the applicant. However, if the language of the international application is English, the letter must be in English; if the language of the international application is French, the letter must be in French.

NOTES TO FORM PCT/ISA/220 (continued)

The letter must indicate the differences between the claims as filed and the claims as amended. It must, in particular, indicate, in connection with each claim appearing in the international application (it being understood that identical indications concerning several claims may be grouped), whether

- (i) the claim is unchanged;
- (ii) the claim is cancelled;
- (iii) the claim is new;
- (iv) the claim replaces one or more claims as filed;
- (v) the claim is the result of the division of a claim as filed.

The following examples illustrate the manner in which amendments must be explained in the accompanying letter:

1. [Where originally there were 48 claims and after amendment of some claims there are 51]:
"Claims 1 to 29, 31, 32, 34, 35, 37 to 48 replaced by amended claims bearing the same numbers; claims 30, 33 and 36 unchanged; new claims 49 to 51 added."
2. [Where originally there were 15 claims and after amendment of all claims there are 11]:
"Claims 1 to 15 replaced by amended claims 1 to 11."
3. [Where originally there were 14 claims and the amendments consist in cancelling some claims and in adding new claims]:
"Claims 1 to 6 and 14 unchanged; claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added." or
"Claims 7 to 13 cancelled; new claims 15, 16 and 17 added; all other claims unchanged."
4. [Where various kinds of amendments are made]:
"Claims 1-10 unchanged; claims 11 to 13, 18 and 19 cancelled; claims 14, 15 and 16 replaced by amended claim 14; claim 17 subdivided into amended claims 15, 16 and 17; new claims 20 and 21 added."

"Statement under Article 19(1)" (Rule 46.4)

The amendments may be accompanied by a statement explaining the amendments and indicating any impact that such amendments might have on the description and the drawings (which cannot be amended under Article 19(1)).

The statement will be published with the international application and the amended claims.

It must be in the language in which the international application is to be published.

It must be brief, not exceeding 500 words if in English or if translated into English.

It should not be confused with and does not replace the letter indicating the differences between the claims as filed and as amended. It must be filed on a separate sheet and must be identified as such by a heading, preferably by using the words "Statement under Article 19(1)."

It may not contain any disparaging comments on the international search report or the relevance of citations contained in that report. Reference to citations, relevant to a given claim, contained in the international search report may be made only in connection with an amendment of that claim.

Consequence if a demand for international preliminary examination has already been filed

If, at the time of filing any amendments and any accompanying statement, under Article 19, a demand for international preliminary examination has already been submitted, the applicant must preferably, at the time of filing the amendments (and any statement) with the International Bureau, also file with the International Preliminary Examining Authority a copy of such amendments (and of any statement) and, where required, a translation of such amendments for the procedure before that Authority (see Rules 55.3(a) and 62.2, first sentence). For further information, see the Notes to the demand form (PCT/IPEA/401).

If a demand for international preliminary examination is made, the written opinion of the International Searching Authority will, except in certain cases where the International Preliminary Examining Authority did not act as International Searching Authority and where it has notified the International Bureau under Rule 66.1bis(b), be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority. If a demand is made, the applicant may submit to the International Preliminary Examining Authority a reply to the written opinion together, where appropriate, with amendments before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later (Rule 43bis.1(c)).

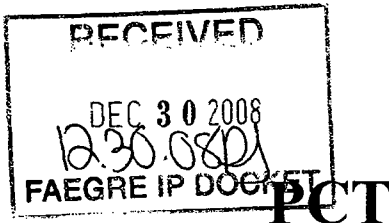
Consequence with regard to translation of the international application for entry into the national phase

The applicant's attention is drawn to the fact that, upon entry into the national phase, a translation of the claims as amended under Article 19 may have to be furnished to the designated/elected Offices, instead of, or in addition to, the translation of the claims as filed.

For further details on the requirements of each designated/elected Office, see the *PCT Applicant's Guide*, Volume II.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT/US2008/059472



From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

RJH

HANSON, Roberta Jean
Faegre & Benson LLP
2200 Wells Fargo Center 90 South Seventh Street
Minneapolis, Minnesota 55402
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

DOCKETED

NOTIFICATION CONCERNING
SUBMISSION OR TRANSMITTAL
OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

Date of mailing (day/month/year) 27 November 2008 (27.11.2008)	
Applicant's or agent's file reference 78484-365434 ✓	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/US2008/059472 ✓	International filing date (day/month/year) 04 April 2008 (04.04.2008)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 06 April 2007 (06.04.2007)
Applicant INVIRAGEN, INC. et al	

1. By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
2. (If applicable) The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, the attention of the applicant is directed to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
3. (If applicable) An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b) (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

Priority date	Priority application No.	Country or regional Office or PCT receiving Office	Date of receipt of priority document
06 April 2007 (06.04.2007)	60/910,579	US	27 October 2008 (27.10.2008)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Simin Baharlou

e-mail PT09.PCT@WIPO.INT
Telephone No. +41 22 338 74 09

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Form PCT/IB/304 (October 2005)

1/DVEXNKKX60

102

PATENT COOPERATION TREATY

WO 2009/014774

PCT/US2008/059472

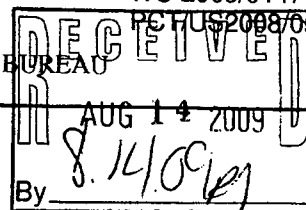
From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

SECOND AND SUPPLEMENTARY NOTICE
INFORMING THE APPLICANT OF THE
COMMUNICATION OF THE INTERNATIONAL
APPLICATION (TO DESIGNATED OFFICES
WHICH APPLY THE 30 MONTH TIME
LIMIT UNDER ARTICLE 22(1))

(PCT Rule 47.1(c))

To: *RJA*



HANSON, Roberta Jean
Faegre & Benson LLP
2200 Wells Fargo Center 90 South Seventh Street
Minneapolis, Minnesota 55402
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

DUCKETED

Date of mailing (day/month/year)
06 August 2009 (06.08.2009)

Applicant's or agent's file reference
78484-365434 ✓

IMPORTANT NOTICE

International application No.
PCT/US2008/059472 ✓

International filing date (day/month/year)
04 April 2008 (04.04.2008)

Priority date (day/month/year)
06 April 2007 (06.04.2007)

Applicant

INVIRAGEN, INC. et al

- ATTENTION:** For any designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002 (30 months from the priority date), **does not apply**, please see Form PCT/IB/308(First Notice) issued previously.
- Notice is hereby given that the following designated Office(s), for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, has/have requested that the communication of the international application, as provided for in Article 20, be effected under Rule 93bis.1. The International Bureau has effected that communication on the date indicated below:
29 January 2009 (29.01.2009)

AU, AZ, BY, CN, CO, DZ, EP, HU, KG, KP, KR, MD, MK, MY, MZ, NA, NG, PG, RU, SY, TM, US

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(i), those Offices will accept the present notice as conclusive evidence that the communication of the international application has duly taken place on the date of mailing indicated above and no copy of the international application is required to be furnished by the applicant to the designated Office(s).

- The following designated Offices, for which the time limit under Article 22(1), as in force from 1 April 2002, **does apply**, have not requested, as at the time of mailing of the present notice, that the communication of the international application be effected under Rule 93bis.1:

AE, AG, AL, AM, AO, AP, AT, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BZ, CA, CH, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, EA, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KM, KN, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LY, MA, ME, MG, MN, MW, MX, NI, NO, NZ, OA, OM, PH, PL, PT, RO, RS, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SV, TJ, TN, TR, TT, UA, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW

In accordance with Rule 47.1(c-bis)(ii), those Offices accept the present notice as conclusive evidence that the Contracting State for which that Office acts as a designated Office does not require the furnishing, under Article 22, by the applicant of a copy of the international application.

4. TIME LIMITS for entry into the national phase

For the designated or elected Office(s) listed above, the applicable time limit for entering the national phase will, **subject to what is said in the following paragraph**, be **30 MONTHS** from the priority date.

In practice, **time limits other than the 30-month time limit** will continue to apply, for various periods of time, in respect of certain of the designated or elected Office(s) listed above. For **regular updates on the applicable time limits** (30 or 31 months, or other time limit), Office by Office, refer to the *PCT Gazette*, the *PCT Newsletter* and the *PCT Applicant's Guide*, Volume II, National Chapters, all available from WIPO's Internet site, at <http://www.wipo.int/pct/en/index.html>.

It is the applicant's **sole responsibility** to monitor all these time limits.

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Authorized officer

Simin Baharlou

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US 08/59472

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(8) - C12N 7/04 (2008.04)

USPC - 435/236

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

USPC- 435/236

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

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

PubWEST, Google Scholar

Search Terms: attenuated virus, surfactant, molecular weight, carbohydrate, sugar, flavivirus, pluronic F127, trehalose, serum albumin, lactalbumin, fetoprotein, bitamin D binding protein, sorbitol, chitosan, mannitol, sucrose, togavirus, coronavirus, Rhabdovirus, Filovirus

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2005/0255121 A1 (CAMPBELL et al.), 17 Nov 2005 (17.11.2005), para [0029], [0030], [0037], [0078], [0103], [0107], [0115], [0135], [0140], [0141], [0146], [0147], [0160], [0177], [0193], [0223], [0225], [0317], [0323]	1-32
A	US 2005/0276785 A1 (GROETZBACH et al.), 15 Dec. 2005 (15.12.2005), para [0180]	1-32

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

* Special categories of cited documents:

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

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

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 Dec. 2008 (08.12.2008)

Date of mailing of the international search report

16 DEC 2008

Name and mailing address of the ISA/US

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

Facsimile No. 571-273-3201

Authorized officer:

Lee W. Young

PCT Helpdesk: 571-272-4300

PCT OSP: 571-272-7774

REQUISITOS MÍNIMOS PARA ADMISIÓN A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION

[4]

MODELO DE UTILIDAD []

- ◆ Indicación de que se solicita la concesión de una patente
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Descripción de la invención
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

[]
[]
[]
[]
[]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

DISEÑO INDUSTRIAL []

- ◆ Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

[]
[]
[]
[]

COMPLETA []

INCOMPLETA []

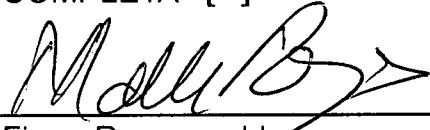
ESQUEMA DE TRAZADO []

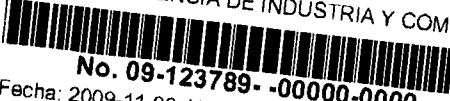
- ◆ Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado
- ◆ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ◆ Representación gráfica del esquema trazado
- ◆ Comprobante de pago de las tasas establecidas

[]
[]
[]
[]

COMPLETA []

INCOMPLETA []


Firma Responsable

Fecha. 
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 09-123789- -00000-0000
Fecha: 2009-11-03 16:18:02 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 104

arrera 13 No. 27-00 Piso 5,7y10
Conmutador: 3 82 0840
Fax: 3505220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá D.C. - Colombia



Bogotá,
2020

Doctor(a)
RODRIGUEZ D^a ALEMAN DILIA MARIA

106

REFERENCIA	Radicación No.	9 123789
	Solicitud internacional	PCT/US2008/059472
	Fecha inicio fase nacional	06/11/2009
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	371

Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

2. La solicitud no contiene la copia del documento en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante, conforme a lo establecido por el artículo 26 literal k) de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina. Cuando se trate de documentos otorgados en el extranjero, estos deberán legalizarse de conformidad con lo dispuesto por los artículos 259 y 260 del Código de Procedimiento Civil. Cuando se trate de las declaraciones a que hace referencia la Regla 4.17 ii) del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes PCT., el alcance de las tales declaraciones se determinará según indiquen claramente una cesión de derechos del inventor al solicitante o su causante, de conformidad con lo dispuesto en el numeral 5.2.15 del Capítulo Quinto, Título X de la Circular Única de Superintendencia de Industria y Comercio.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Única No.10 de 2001.

Continúa en la página siguiente...



Radicación No.: 9 123789

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

107


JESUS FERNEL GARCIA GARCIA

Director de Nuevas Creaciones (E)

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de
fecha 13 ENE. 2010
adpall

Al contestar favor indique el número
de radicación consignado en el rótulo

Sede Centro: Carrera 13 No. 27-00 pisos 2, 5, 7 y 10 PBX: 5870000
Sede CAN: Av. Carrera 50 No. 26 - 55 int.2. Tel 5880070
Call Center 6513240. Línea 01800-910165
Web: www.sic.gov.co e-mail: info@sic.gov.co
Bogotá D.C. Colombia