



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Delegatura de propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD
PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No.

03-27702

54. TÍTULO Preparación de virus con envoltorio dividido

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A 61K 39/155

71. SOLICITANTE Glenasmithline Biologicals S.A.

DOMICILIO Luxemburg, Bélgica

74. APODERADO Jose María Morales

TP. 12.734
coleg 281

22. BOGOTÁ, D. C., 2 abril 2003

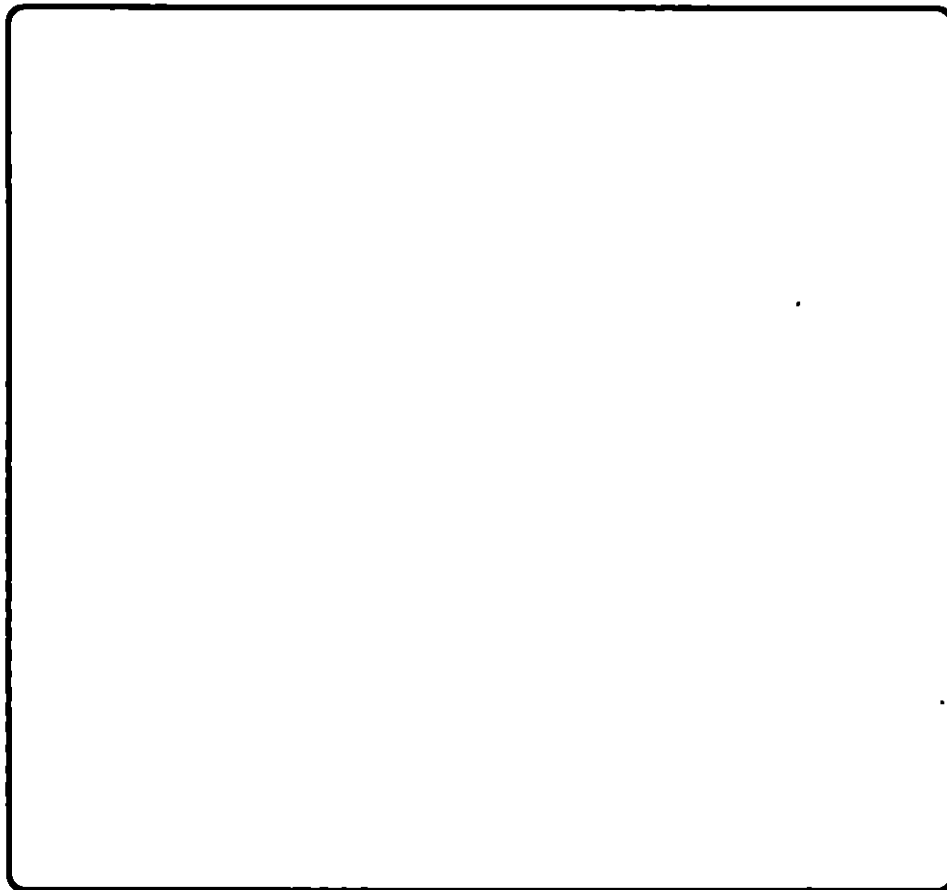
10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- ☐ Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- ☐ Documento de Representación Legal.
- ☐ 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 del contrato de acceso.
- ☐ De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, Información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- ☐ De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud Internacional.
- ☒ Otros Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción y Capítulo Reivindicatorio como fue originalmente presentado en Fase Internacional

11

FIGURA CARACTERISTICA:



12

Solicito la concesión de la patente.

NOMBRE: JOSE ANTONIO LLORIDA

FIRMA:

C.C. 17.159.681 Bg T.P. 10.784

PC

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO
Radicacion : 03027702 00000000 Folios: 116
Fecha (UMB): 2003-04-02 16:06:40 CIA
Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE MACI 411 PRESENTAC
Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800174089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 86,481
FECHA : DICIEMBRE 24 DE 2002

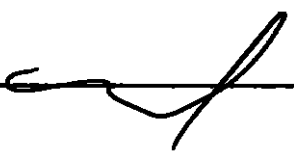
***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	Nº. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	3139931	24/12/2002	149,623,700.00

***** CONCEPTO *****

CANT. RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	378,000.00
	TOTAL :	\$ 378,000.00

SON: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

Carrera 13 No. 27-00 Pisos 5, 7 y 10
Conmutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



Industria y Comercio

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicación : 03027702 00000000

Folios: 116 **1A**

Fecha (AMB): 2003-04-02 16:06:40

Trámite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

MIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 03 - 15,522
FECHA : MARZO 4 DE 2003

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	8284110	04/03/2003	345,000.00

***** CONCEPTO *****

CANT. CONTABILITICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1 50005-01-09 OTROS SERVICIOS DE PROPIEDAD I	99 OTROS SERVICIOS ADMINISTRATIVOS	22,000.00
	TOTAL :	\$ 22,000.00

SON: VEINTIDOS 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.

Cajera: 3 No. 27-00 pisos 5, 7 y 10
Commutador 382 0840
Fax 350 5220
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 01/11328

A. CLASIFICACION DE MATERIA OBJETO
IPC 7 A61K39/155 C12N7/06 A61K39/295 A61P31/12

Según la Clasificación de Patente Internacional (IPC) o según la clasificación nacional y la IPC

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)

IPC 7 C07K A61K C12N

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Internacional, BIOSIS, EMBASE, WPI Dato, MEDLINE, SCISEARCH, CHEM ABS Dato

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	EP 0 864 646 A (IMMUNO AG) 16 de Septiembre de 1998 (1998-09-16)	1-6, 20, 22-30
Y	página 2, línea 39-línea 43 página 3, línea 35-línea 38; reivindicaciones 1-20	7-19, 21
X	GB 2 001 326 A (SANDOZ LTD) 31 de Enero de 1979 (1979-01-31)	1-6, 20, 22-30
Y	página 1, línea 34-línea 42	7-19, 21
X	US 4 206 014 A (MAJER MIRKO ET AL) 3 de Junio de 1980 (1980-06-03)	1-6, 20, 22-30
Y	columna 2, línea 8-línea 28	7-9, 21
X	GB 1 486 557 A (FLOCKHART & CO) 21 de Septiembre de 1977 (1977-09-21)	1-6, 20, 22-30
Y	página 1, línea 13-línea 23	7-9, 21

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

* Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia particular

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional

14 de Marzo de 2002

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

27/03/2002

Nombre y dirección de correo de ISA
European Patent Office, P. B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Niemann, F

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 01/11328

58
5

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	DATABASE BIOSIS 'Online! BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1989 TRETYAKOV YU K ET AL: "PARTICIÓN DEL VIRUS DE PARAINFLUENZA TIPO 3 Y LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD INMUNOGÉNICA DE LA VACUNA PARTIDA" Database accession no. PREV199090051148 XP002193127	1-6, 20, 22-30
Y	resumen & IZVESTIYA AKADEMII NAUK KAZAKHSKOI SSR SERIYA BIOLOGICHESKAYA, no. 6, 1989, páginas 60-63, ISSN: 0002-3183	7-9, 21
Y	— WO 99 52549 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG; FRIEDE MARTIN (BE); HERMAND PHILIPPE (B) 21 de Octubre de 1999 (1999-10-21) el documento completo	7-9, 21
A	— US 4 522 809 A (ADAMOWICZ PHILIPPE ET AL) 11 de Junio de 1985 (1985-06-11) el documento completo	
A	— DATABASE EMBASE 'Online! ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 1973 TYRRELL D.A.J.: "Algunas tendencias recientes en la vacunación contra virus de las vías respiratorias! TENDENCIAS RECIENTES EN LA VACUNACION CONTRA VIRUS DE LAS VIAS RESPIRATORIAS." retrieved from STN Database accession no. 74118747 XP002193128 resumen & BOLETIN DE LA OFICINA SANTARIA PANAMERICANA, (1973) 75/3 (225-238). CODEN: BOSPA8,	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Informe sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No.

PCT/EP 01/11328

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
EP 0864646 A	16-09-1998	AT	405939 B	27-12-1999
		AT	29997 A	15-05-1999
		EP	0864646 A2	16-09-1998
		JP	10234362 A	08-09-1998
		US	6136321 A	24-10-2000
GB 2001326 A	31-01-1979	AU	3797378 A	17-01-1980
		BE	868916 A1	11-01-1979
		DE	2829089 A1	01-02-1979
		DK	302978 A	14-01-1979
		ES	471615 A1	01-10-1979
		FI	782155 A	14-01-1979
		FR	2397195 A1	09-02-1979
		JP	54020130 A	15-02-1979
		NL	7807367 A	16-01-1979
		PT	68275 A	01-08-1978
		SE	7807554 A	14-01-1979
		ZA	7803998 A	27-02-1980
US 4206014 A	03-06-1980	DE	2750045 A1	10-05-1979
		DE	2860153 D1	11-12-1980
		DK	497078 A	10-05-1979
		EP	0001838 A1	16-05-1979
		ES	474811 A1	16-03-1979
		IT	1100479 B	28-09-1985
		JP	54080409 A	27-06-1979
		PT	68765 A	01-12-1978
GB 1486557 A	21-09-1977	AT	334524 B	25-01-1976
		AT	835074 A	15-05-1976
		AU	7444974 A	29-04-1976
		BE	821175 A1	17-04-1975
		CA	1050886 A1	20-03-1979
		CH	611518 A5	15-06-1979
		DE	2449530 A1	30-04-1975
		DK	543974 A,B,	16-06-1975
		FR	2248054 A1	16-05-1975
		IE	40187 B1	28-03-1979
		IL	45870 A	10-03-1978
		JP	50082228 A	03-07-1975
		NL	7413642 A,B,	22-04-1975
		NO	743758 A,B,	12-05-1975
		SE	426439 B	24-01-1983
		SE	7413113 A	21-04-1975
		US	4158054 A	12-06-1979
		ZA	7406398 A	30-06-1976
WO 9952549 A	21-10-1999	AU	3419799 A	01-11-1999
		BR	9909915 A	26-12-2000
		CN	1296416 T	23-05-2001
		WO	9952549 A1	21-10-1999
		EP	1069910 A1	24-01-2001
		HU	0101619 A2	28-08-2001
		NO	20005051 A	21-11-2000
		TR	200002930 T2	21-12-2000
US 4522809 A	11-06-1985	FR	2475572 A1	14-08-1981
		CA	1158978 A1	20-12-1983

INFORMACION ADICIONAL DE PCT/ISA/210

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró múltiples (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional, como sigue:

1. Reivindicaciones: 1-30 (parcialmente)

una formulación de vacuna que comprende una preparación de la envoltura rota del virus en donde el virus es RSV

2. Reivindicaciones: 1-30 (parcialmente)

una formulación de vacuna que comprende una preparación de la envoltura rota del virus en donde el virus es PIV

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/EP 01/11328

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/155 C12N7/06 A61K39/295 A61P31/12

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C07K A61K C12N

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 practical, search terms used)

EPO-Internal, BIOSIS, EMBASE, WPI Data, MEDLINE, SCISEARCH, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 864 646 A (IMMUNO AG) 16 September 1998 (1998-09-16)	1-6, 20, 22-30
Y	page 2, line 39 - line 43 page 3, line 35 - line 38; claims 1-20	7-19, 21
X	GB 2 001 326 A (SANDOZ LTD) 31 January 1979 (1979-01-31)	1-6, 20, 22-30
Y	page 1, line 34 - line 42	7-19, 21
X	US 4 206 014 A (MAJER MIRKO ET AL) 3 June 1980 (1980-06-03)	1-6, 20, 22-30
Y	column 2, line 8 - line 28	7-9, 21
X	GB 1 486 557 A (FLOCKHART & CO) 21 September 1977 (1977-09-21)	1-6, 20, 22-30
Y	page 1, line 13 - line 23	7-9, 21
	-/-	



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* 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 document 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 relating 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
'Z' document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

14 March 2002

Date of mailing of the international search report

27/03/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.O. Box 1
NL - 3720 BP Utrecht
Tel. (+31-70) 340-3200, Tlx 31 851 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3010

Authorized officer

Niemann, F

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int'l Application No
PCT/EP 01/11328

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE BIOSIS 'Online' BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1989 TRET'YAKOV YU K ET AL: "SPLITTING OF PARAINFLUENZA VIRUS TYPE 3 AND THE EVALUATION OF SPLIT VACCINE IMMUNOGENIC ACTIVITY" Database accession no. PREV199090051148 XP002193127	1-6, 20, 22-30
Y	abstract & IZVESTIYA AKADEMII NAUK KAZAKHSKOI SSR SERIYA BIOLOGICHESKAYA, no. 6, 1989, pages 60-63, ISSN: 0002-3183	7-9, 21
Y	WO 99 52549 A (SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG ;FRIEDE MARTIN (BE); HERMAND PHILIPPE (B) 21 October 1999 (1999-10-21) the whole document	7-9, 21
A	US 4 522 809 A (ADAMOWICZ PHILIPPE ET AL) 11 June 1985 (1985-06-11) the whole document	
A	DATABASE EMBASE 'Online' ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL; 1973 TYRRELL D.A.J.: "Some recent trends in vaccination against respiratory viruses!. TENDENCIAS RECIENTES EN LA VACUNACION CONTRA VIRUS DE LAS VIAS RESPIRATORIAS." retrieved from STN Database accession no. 74118747 XP002193128 abstract & BOLETIN DE LA OFICINA SANITARIA PANAMERICANA, (1973) 75/3 (225-238). CODEN: BOSPAB,	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Info and Application No

PCT/EP 01/11328

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0864646 A	16-09-1998	AT 405939 B AT 29997 A EP 0864646 A2 JP 10234362 A US 6136321 A	27-12-1999 15-05-1999 16-09-1998 08-09-1998 24-10-2000
GB 2001326 A	31-01-1979	AU 3797378 A BE 868916 A1 DE 2829089 A1 DK 302978 A ES 471615 A1 FI 782155 A FR 2397195 A1 JP 54020130 A NL 7807367 A PT 68275 A SE 7807554 A ZA 7803998 A	17-01-1980 11-01-1979 01-02-1979 14-01-1979 01-10-1979 14-01-1979 09-02-1979 15-02-1979 16-01-1979 01-08-1978 14-01-1979 27-02-1980
US 4206014 A	03-06-1980	DE 2750045 A1 DE 2860153 D1 DK 497078 A EP 0001838 A1 ES 474811 A1 IT 1100479 B JP 54080409 A PT 68765 A	10-05-1979 11-12-1980 10-05-1979 16-05-1979 16-03-1979 28-09-1985 27-06-1979 01-12-1978
GB 1486557 A	21-09-1977	AT 334524 B AT 835074 A AU 7444974 A BE 821175 A1 CA 1050886 A1 CH 611518 A5 DE 2449530 A1 DK 543974 A ,B, FR 2248054 A1 IE 40187 B1 IL 45870 A JP 50082228 A NL 7413642 A ,B, NO 743758 A ,B, SE 426439 B SE 7413113 A US 4158054 A ZA 7406398 A	25-01-1976 15-05-1976 29-04-1976 17-04-1975 20-03-1979 15-06-1979 30-04-1975 16-06-1975 16-05-1975 28-03-1979 10-03-1978 03-07-1975 22-04-1975 12-05-1975 24-01-1983 21-04-1975 12-06-1979 30-06-1976
WO 9952549 A	21-10-1999	AU 3419799 A BR 9909915 A CN 1296416 T WO 9952549 A1 EP 1069910 A1 HU 0101619 A2 NO 20005051 A TR 200002930 T2	01-11-1999 26-12-2000 23-05-2001 21-10-1999 24-01-2001 28-08-2001 21-11-2000 21-12-2000
US 4522809 A	11-06-1985	FR 2475572 A1 CA 1158978 A1	14-08-1981 20-12-1983

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

This International Searching Authority found multiple (groups of) inventions in this international application, as follows:

1. Claims: 1-30 (partially)

a vaccine formulation comprising a split enveloped virus preparation wherein the virus is RSV

2. Claims: 1-30 (partially)

a vaccine formulation comprising a split enveloped virus preparation wherein the virus is PIV

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA DE ACUERDO CON EL TRATADO DE COOPERACIÓN EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
Oficina Internacional

WIPO

(43) Fecha de publicación internacional
11 de Abril de 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) Número de publicación internacional
WO 02/28426 A1

(51) Clasificación de Patentes Internacional⁷: A81K 39/155, C12N 7/08, A81K 39/295, A81P 31/12

(74) Agentes: STEPHEN, Robert, J. et al; GlaxoSmithKline Corporate Intellectual Property (CN9.25.1), 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

(21) Número de Solicitud Internacional: PCT/EP01/11328

(22) Fecha de Presentación Internacional:
1 de Octubre de 2001 (01.10.2001)

(81) Estados Designados (nacionales): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(25) Idioma de Presentación: Inglés

(26) Idioma de Publicación: Inglés

(30) Información de Prioridad:
0224088.7 2 de Octubre de 2000 (02.10.2000) GB
0109288.1 12 de Abril de 2001 (12.04.2001) GB

(84) Estados Designados (regionales): Patente ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Patente Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), Patente Europea (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), Patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto US): SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. [BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (solamente para US): COLAU, Brigitte, Desiree, Alberte [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals, rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). DESCHAMPS, Marguerite [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals, rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

Publicada:

- con reporte de búsqueda internacional.

(48) Fecha de publicación de esta versión corregida:
6 de Junio de 2002

(15) Información acerca de la Corrección:
ver Gaceta del PCT No. 23/2002 de 6 de Junio de 2002. Sección II

Para una explicación de los códigos de dos letras y las demás abreviaciones, refiérase a las explicaciones "Notas de Guía de Códigos y Abreviaciones" al inicio de cada edición regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: PREPARACIÓN DE VIRUS CON ENVOLVENTE DIVIDIDO

(57) Resumen: La invención se refiere a formulaciones de vacuna que comprenden una preparación de virus con envoltente dividido en la que el virus es RSV o PIV, métodos para preparar tales formulaciones, y al uso de tales formulaciones en la prevención o tratamiento de la enfermedad.

CORRECTED VERSION

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
11 April 2002 (11.04.2002)

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/28426 A1

(51) International Patent Classification: A61K 39/155,
C12N 7/06, A61K 39/295, A61P 31/12

(21) International Application Number: PCT/EP01/11328/

(22) International Filing Date: 1 October 2001 (01.10.2001)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
0224088.7 2 October 2000 (02.10.2000) GB
0109288.1 12 April 2001 (12.04.2001) GB

(81) Designated States (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) Designated States (*regional*): ARIPO patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Applicant (*for all designated States except US*):
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.
[BE/BE]: Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

Published:
— with international search report

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants (*for US only*): COLAU, Brigitte,
Desfree, Alberte [BE/BE]: GlaxoSmithKline Bio-
logicals, rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
DESCHAMPS, Marguerite [BE/BE]: GlaxoSmithKline
Biologicals, rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).

(48) Date of publication of this corrected version:
6 June 2002

(15) Information about Correction:
see PCT Gazette No. 23/2002 of 6 June 2002, Section II

(74) Agents: STEPHEN, Robert, J. et al.: GlaxoSmithKline,
Corporate Intellectual Property (CN9.25.1), 980 Great
West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: SPLIT ENVELOPED VIRUS PREPARATION

(57) Abstract: The invention relates to vaccine formulations comprising a split enveloped virus preparation wherein the virus is RSV or PTV, methods of preparing such formulations, and use of such formulations in prevention or treatment of disease.

WO 02/28426 A1

**CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE
ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE
INTERNACIONAL**

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de vacuna caracterizada porque comprende una preparación de un virus con envoltente dividido en
5 donde el virus es RSV o PIV.

2. Una formulación de vacuna según la reivindicación 1, en el que la preparación del virus con envoltente dividido comprende fragmentos de membrana viral, proteínas de envoltente de membrana viral, matriz viral y nucleoproteínas.

10 3. Una formulación de vacuna según la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque la preparación de vacuna comprende además otro virus dividido seleccionado a partir del grupo que consiste en: virus de la influenza, virus sincitial respiratorio, virus de la parainfluenza, metaneumovirus, virus del sarampión, virus de las
15 paperas, virus de Epstein Barr, virus del herpes, citomegalovirus, virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis transmitida por garrapata, virus de la encefalitis Japonesa, virus de la rubéola, virus de la encefalitis equina occidental, oriental y Venezolana; y virus de la inmunodeficiencia humana.

20 4. Una formulación de vacuna según la reivindicación 1 a 3, caracterizada porque comprende adicionalmente uno o más agentes de división residuales.

5. Una formulación de vacuna según la reivindicación 4, caracterizada porque el agente de división residual se selecciona a
25 partir del grupo que consiste en: laureth 9, NaDOC, grupo Sarcosillo, Tween 80™ y Triton X100™.

6. Una formulación de vacuna según la reivindicación 5, caracterizada porque el agente de división residual es NaDOC o Sarkosyl.

7. Una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-6 caracterizada porque comprende además un agente estabilizador.

8. Una formulación de vacuna según la reivindicación 7, caracterizada porque el agente estabilizador es un agente tensioactivo.

9. Una formulación de vacuna según la reivindicación 8, caracterizada porque el agente tensioactivo es solamente o una mezcla de monooleato de sorbitano de polioxietileno (TWEEN80™), t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X100™) y éter de polioxietileno-9-laurilo.

10. Una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada porque la vacuna se formula para suministrarse intranasalmente.

11. Una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-9 caracterizada porque la vacuna se formula para suministrarse intramuscularmente o subcutáneamente.

12. Una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 caracterizada porque la vacuna se formula para suministrarse a través de la ruta transdérmica, intradérmica, intra-epitelial o transcutánea.

13. Una formulación de vacuna según la reivindicación 12, caracterizada porque la vacuna se formula para el suministro intradérmico.

14. Una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada porque comprende además un adyuvante.

15. Una formulación de vacuna según la reivindicación 14, caracterizado porque el adyuvante es éter de polioxietileno-9-laurilo.

16. Una formulación de vacuna según la reivindicación 14, caracterizada porque el adyuvante es un estimulante preferencial de respuesta de células TH1.

5 17. Una formulación de vacuna según la reivindicación 16, caracterizada porque el estimulador preferencial de la respuesta de células TH1 se selecciona a partir del grupo de adyuvantes que comprende: 3D-MPL, QS21, una mezcla de QS21 y colesterol, un oligonucleótido de CpG y combinaciones de los mismos.

10 18. Una formulación de vacuna según la reivindicación 17, caracterizada porque el adyuvante es una formulación adyuvante vesicular que comprende colesterol, una saponina y un derivado LPS.

19. Una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada porque comprende además un portador.

15 20. Un método para producir una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque comprende los pasos para

(a) dividir un virus con envoltente PIV o RSV;

20 (b) mezclar opcionalmente la preparación del virus con envoltente dividido con un agente estabilizador; y

(c) mezclar opcionalmente la preparación del virus con envoltente dividido con un adyuvante

21. Un método para producir una formulación de vacuna según la reivindicación 20, caracterizado porque la preparación de virus dividido se mezcla con un agente estabilizante, comprendiendo el
25 agente estabilizante al menos un agente tensioactivo seleccionado a partir del grupo que comprende monooleato de sorbitano de polioxietileno (TWEEN80™); t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X100™); éter de polioxietileno-9-laurilo.

22. El uso de una preparación de vacuna de RSV o PIV dividido en la elaboración de una vacuna.

23. El uso de una preparación de vacuna de RSV o PIV dividido en la elaboración de una formulación de vacuna para la
5 profilaxis o tratamiento de la enfermedad.

24. Un juego para el suministro de una formulación de vacuna intranasal según cualquiera de las reivindicaciones 1-19 caracterizado porque comprende:

(a) una preparación de virus con envoltente RSV o PIV
10 dividido; y

(b) un dispositivo de suministro intranasal.

25. Un dispositivo de suministro intranasal caracterizado porque comprende una formulación de vacuna dividida según cualquiera de las reivindicaciones 1-19.

15 26. Un método para proteger o tratar un mamífero susceptible a, o que padece la enfermedad ocasionada por el PIV o RSV, caracterizado el método porque comprende administrar una cantidad eficaz de una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-19.

20 27. Un método según la reivindicación 26, caracterizado porque la vacuna se administra por la ruta Intradérmica o Intranasal.

28. El uso de una preparación de vacuna de RSV o PIV dividido en la elaboración de una formulación de vacuna para el suministro intranasal o intradérmico.

25 29. Una formulación, método, uso, juego, o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizados porque la formulación de vacuna es inmunogénica.

30. Una formulación, método, uso, juego, o dispositivo según la reivindicación 29, caracterizados porque la formulación de vacuna es inmunogénica tanto en individuos seropositivos como seronegativos.

5

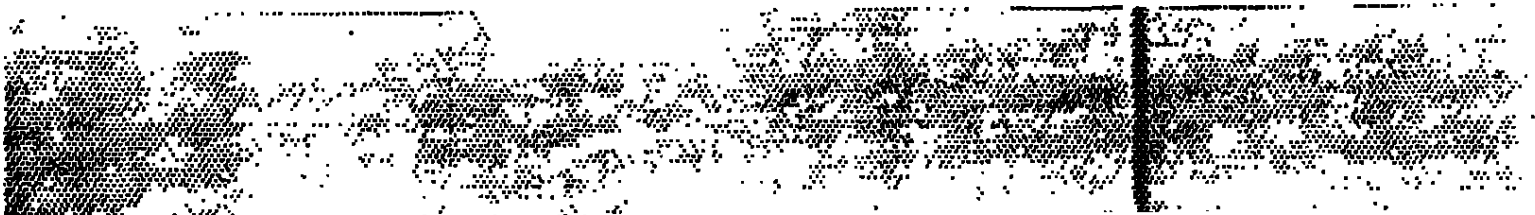
10

15

20

28
70**Claims:**

1. A vaccine formulation comprising a split enveloped virus preparation wherein
5 the virus is RSV or PIV.
2. A vaccine formulation as claimed in Claim 1 wherein the split enveloped virus preparation comprises viral membrane fragments, viral membrane envelope proteins, viral matrix and nucleoproteins.
- 10 3. A vaccine formulation as claimed in Claim 1 or Claim 2 wherein the vaccine preparation additionally comprises another split virus selected from the group consisting of: influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, measles virus, mumps virus, Epstein Barr virus, herpes virus,
15 cytomegalovirus, dengue virus, yellow fever virus, tick-borne encephalitis virus, Japanese encephalitis virus, rubella virus, eastern, western and Venezuelan equine encephalitis viruses; and human immunodeficiency virus.
4. A vaccine formulation as claimed in any one of Claims 1 - 3 which
20 additionally comprises one or more residual splitting agents.
5. A vaccine formulation as claimed in Claim 4 wherein the residual splitting agent is selected from the group consisting of: laurth 9, NaDOC, Sarcosyl group, Tween 80™ and Triton X100™.
- 25 6. A vaccine formulation according to Claim 5 wherein the residual splitting agent is NaDOC or Sarkosyl.
7. A vaccine formulation as claimed in any one of Claims 1 - 6 which
30 additionally comprises a stabilising agent
8. A vaccine formulation as claimed in Claim 7 wherein the stabilising agent is a surfactant.

- 24
21
9. A vaccine formulation as claimed in claim 8 wherein the surfactant is either singly or a mixture of polyoxyethylene sorbitan monooleate (TWEEN80™), t-octylphenoxypolyethoxyethanol (TRITON X100™) and polyoxyethylene-9-lauryl ether.
10. A vaccine formulation as claimed in any one of the preceding claims wherein the vaccine is formulated to be delivered intranasally.
- 10 11. A vaccine formulation as claimed in any one of Claims 1 – 9 wherein the vaccine is formulated to be delivered intramuscularly or subcutaneously.
12. A vaccine formulation as claimed in any one of claims 1-8 wherein the vaccine is formulated to be delivered via the transdermal, intradermal, intra-epithelial or transcutaneous route.
- 15 13. A vaccine formulation according to claim 12, wherein the vaccine is formulated for intradermal delivery.
14. A vaccine formulation as claimed in any one of the preceding claims which additionally comprises an adjuvant.
15. A vaccine formulation according to claim 14 wherein the adjuvant is polyoxyethylene-9-lauryl ether.
- 25 16. A vaccine formulation according to claim 14 wherein the adjuvant is a preferential stimulator of TH1 cell response.
17. A vaccine formulation as claimed in claim 16 wherein the preferential stimulator of TH1-cell response is selected from the group of adjuvants comprising: 3D-MPL, QS21, a mixture of QS21 and cholesterol, a CpG oligonucleotide and combinations thereof.
- 30
- 

25
22

18. A vaccine formulation according to claim 17 wherein the adjuvant is a vesicular adjuvant formulation comprising cholesterol, a saponin and an LPS derivative.

5 19. A vaccine formulation as claimed in any preceding claim which additionally comprises a carrier.

20 A method of producing a vaccine formulation as claimed in any one of the preceding claims which comprises the steps of

- 10 (a) splitting a PIV or RSV enveloped virus;
(b) optionally admixing the split enveloped virus preparation with a stabilising agent;
and
(c) optionally admixing the split enveloped virus preparation with an adjuvant.

15 21. A method of producing a vaccine formulation as claimed in Claim 20 wherein the split virus preparation is admixed with a stabilising agent, the stabilising agent comprising at least one surfactant selected from the group comprising polyoxyethylene sorbitan monooleate (TWEEN80™); t-octylphenoxy polyethoxyethanol (TRITON X100™); polyoxyethylene-9-lauryl ether.

20

22. Use of a split RSV or PIV vaccine preparation in the manufacture of a vaccine.

23. Use of a split RSV or PIV vaccine preparation in the manufacture of a vaccine
25 formulation for the prophylaxis or treatment of disease.

24. A kit for delivery of an intranasal vaccine formulation as claimed in any one of claims 1 - 19 comprising:

- (a) a split RSV or PIV enveloped virus preparation; and
30 (b) an intranasal delivery device.

25. An intranasal delivery device comprising a split vaccine formulation according to any of claims 1-19.

26. A method for protecting or treating a mammal susceptible to, or suffering from disease caused by PIV or RSV, the method comprising administering an effective amount of a vaccine according to any of claims 1-19.

5

27. A method according to claim 26, wherein the vaccine is administered by intradermal or intranasal route.

10

28. Use of a split RSV or PIV vaccine preparation in the manufacture of a vaccine formulation for intranasal or intradermal delivery.

29. A formulation, method, use, kit, or device according to any preceding claim, wherein the vaccine formulation is immunogenic.

15

30. A formulation, method, use, kit, or device according to claim 30, wherein the vaccine formulation is immunogenic in both seropositive and seronegative individuals.

27
24

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente RS/FL/B45243	PARA FUTURAS ACCIONES Ver Notificación o Transmisión del Reporte de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA/416)	
Solicitud Internacional No. PCT/EP01/11328	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 01/10/2001	Fecha de prioridad (día/mes/año) 02/10/2000
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC 7 A61K39/155		
Solicitante SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.		

1. Este reporte de examen preliminar internacional ha sido preparado por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional y se transmite al solicitante de conformidad con el Artículo 36. 2. Este REPORTE consta de un total de <u>8</u> páginas, incluyendo la carátula. ☒ Este reporte también está acompañado de ANEXOS, es decir, páginas de descripción, reivindicaciones y/o dibujos que han sido modificados y son la base de este informe y/o páginas que contienen rectificaciones hechas ante esta Autoridad (ver Regla 70.16 y la Sección 607 de las Instrucciones Administrativas de conformidad con el PCT). Estos anexos constan de un total de <u>4</u> páginas.	
3. Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: I ☒ Bases del Reporte II ☐ Prioridad III ☒ No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial. IV ☒ Falta de unidad de invención V ☒ Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación. VI ☐ Ciertos documentos citados VII ☐ Ciertos defectos en la solicitud internacional VIII ☐ Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional	
Fecha de presentación de la demanda 05/04/2002	Fecha de terminación de este reporte 02.12.2002
Nombre y dirección de la autoridad internacional de examen preliminar: European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399- 4465	Funcionario autorizado BROCHADO GARGANTA, M Teléfono No. +49 89 2399 8935

Forma PCT/IPEA/409 (carátula) (Enero 1994)

**REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR
INTERNACIONAL**

Solicitud internacional No. PCT/EP01/11328

I. Bases del Reporte

1. Respecto a los elementos de la solicitud internacional: (Páginas de remplazo que han sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación bajo el artículo 14 están referenciados en este reporte como "presentados originalmente" y no están anexos a este reporte dado que no contienen modificaciones (Reglas 70.16 y 70.17):

Descripción, Páginas:

1-36 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, No.:

1-29 como se recibieron en 30/10/2002 con carta de 29/10/2002

Dibujos, hojas:

1/18-18/18 como se presentaron originalmente

2. Respecto al idioma, todos los elementos marcados anteriormente estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma en el cual la solicitud internacional fue presentada, a menos que se indique lo contrario bajo este ítem.

Estos elementos estuvieron disponibles o fueron suministrados a esta Autoridad en el idioma, el cual es:

- ☐ el idioma de una traducción suministrada para una búsqueda internacional (según la Regla 23.1 (b)).
- ☐ el idioma de una publicación de la solicitud internacional (según la Regla 48.3 (b)).
- ☐ el idioma de la traducción suministrada para el examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 y/o 55.3).

3. Respecto al nucleótido y/o secuencia amino ácida revelado en la solicitud internacional, se llevó a cabo el examen preliminar internacional según el listado de secuencia:

- ☐ contenido en la solicitud internacional en forma escrita.
- ☐ registrado junto con la solicitud internacional en forma legible por computador.
- ☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma escrita.
- ☐ proporcionado subsiguientemente a esta Autoridad en forma legible por computador.
- ☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual el listado de secuencia escrito proporcionado subsiguientemente no va más allá de la revelación en la solicitud internacional según se presentó.
- ☐ Se ha proporcionado la afirmación respecto a la cual la información presentada en forma legible por computador es idéntica al listado de secuencia escrita.

4. Las modificaciones han resultado en la cancelación de:

- ☐ la descripción, páginas
- ☐ las reivindicaciones, Nos.

**REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR
INTERNACIONAL**

Solicitud internacional No. PCT/EP01/11328

☐ los dibujos, páginas

5. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (algunas) de las modificaciones no se hubiesen hecho, ya que se ha considerado que van más allá de la revelación según se presentó, como se indicó en Casilla Suplementaria (Regla 70.2 (c)):

(Cualquier hoja de remplazo que contenga tales modificaciones debe ser referida bajo el ítem 1 y anexada a este reporte.)

6. Observaciones adicionales, si son necesarias:

III. No-establecimiento de opinión respecto a la novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

1. Las preguntas como quiera que la invención reivindicada parezca ser novedosa, para comprender un nivel inventivo (para no ser obvio), o para ser aplicable industrialmente no se han examinado en relación con:

☐ toda la solicitud internacional.☒ las reivindicaciones Nos. 25-26(totalmente), 28-29 (parcialmente).

Porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 25-26(totalmente), 28-29(parcialmente), con respecto a la aplicabilidad industrial se relaciona con el siguiente asunto/materia que no requiere examen preliminar Internacional (especificar):
Ver hoja separada

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (indican elementos particulares a continuación) o dichas reivindicaciones Nos. Son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (especifique):

☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa.

☐ no se ha establecido un informe de búsqueda internacional para dichas reivindicaciones Nos.

2. Un examen internacional significativo no puede llevarse a cabo debido a la falla del nucleótido y/o listado de secuencia amino ácida para cumplir con el estándar preparado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas:

☐ el formulario escrito no ha sido proporcionado o no cumple con el estándar.

☐ la forma legible por computador no ha sido proporcionado o no cumple con el estándar.

IV. Falta de unidad de invención

1. En respuesta a la invitación para restringir o pagar derechos adicionales el solicitante ha:

☐ restringido las reivindicaciones.

30
27

**REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR
INTERNACIONAL**

Solicitud internacional No. PCT/EP01/11328

- ☐ pagado derechos adicionales.
- ☐ pagado derechos adicionales bajo protesta.
- ☐ ni restringido ni pagado derechos adicionales.
2. ☐ Esta Autoridad encontró que el requisito de unidad de invención no se ha cumplido y escogió, de conformidad con la Regla 68.1, no invitar al solicitante para que restrinja o pague derechos adicionales.
3. Esta Autoridad considera que el requisito de unidad de invención de acuerdo con las Reglas 13.1, 13.2 y 13.3

☐ se ha cumplido.

☒ no se ha cumplido por las siguientes razones:
ver hoja separada.
4. Por consiguiente, las siguientes partes de la solicitud internacional fueron el objeto del examen preliminar internacional para establecer en este reporte:

☒ Todas las partes.

☐ Las partes que se relacionan con las reivindicaciones Nos.

V. Afirmación razonada bajo el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Sí:	Reivindicaciones	1-18, 23-26
	No:	Reivindicaciones	19-22, 27-29
Nivel inventivo (IS)	Sí:	Reivindicaciones	1-18, 23-26
	No:	Reivindicaciones	19-22, 27-29
Aplicabilidad industrial (IA)	Sí:	Reivindicaciones	1-24, 27 (totalmente), 28-29(parcialmente)
	No:	Reivindicaciones	
2. Citas y explicaciones
Ver hoja separada

Re Item I**Bases del reporte**

1. Las enmiendas presentadas el 30.10.02 no introducen un objeto adicional, que se extienda más allá del contenido de la solicitud según se presenta. Por lo tanto, las enmiendas cumplen los requisitos del Artículo 34(2)(b) PCT.

Re Item III**N establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial**

1. Las reivindicaciones 25-26 (completamente) y 28-29 (parcialmente) están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal. Por lo tanto, se relacionan con un objeto considerado por esta Autoridad cubierto por las disposiciones de la Norma 67.1(iv) PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial del objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) PCT.

Re Item IV**Falta de unidad de la invención**

1. La Autoridad de Búsqueda Internacional encontró 2 (grupos de) invenciones en esta solicitud internacional (ver ISR).

Re Item V**Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación**

1. Se hace referencia a los siguientes documentos:

(D1) EP-A-0 864 646

32
29

(D2) GB-A-2 001 326

(D3) US-A-4 206 014

(D4) GB-A-1 486 557

(D5) DATABASE BIOSIS [En línea] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1989 TRET'YAKOV YU K ET AL: 'DIVISION DEL VIRUS DE PARAINFLUENZA TIPO 3 Y LA EVALUACION DE LA ACTIVIDAD INMUNOGENICA DE VACUNAS DIVIDIDAS' Acceso a la base de datos no. PREV199090051148 XP002193127 & IZVESTIYA AKADEMII NAUK KAZAKHSKOI SSR SERIYA BIOLOGICHESKAYA, no. 6, 1989, páginas 60-63, ISSN: 0002-3183

2. Novedad

2.1 El objeto de la reivindicación 1, que se relaciona con una formulación de vacuna que comprende una preparación del virus RSV recubierta y dividida, en la cual el virus comprende fragmentos de membrana viral, proteínas recubiertas de membrana viral, matriz viral y nucleoproteínas, es novedoso en el sentido del Artículo 33(2) PCT, porque una formulación de vacuna que tiene una matriz viral y nucleoproteínas no ha sido revelada en la técnica anterior.

D2 revela vacunas que tienen virus de parainfluenza o virus Syncytial Respiratorio (RSV), en el cual la preparación del virus contiene únicamente glicoproteínas aisladas y se divide por medio de la adición de un detergente catiónico (ver página 1).

Las reivindicaciones dependientes 2-18 por lo tanto son novedosas (Artículo 33(2) PCT).

Los documentos D1 y D3-D5 no se consideran que destruyen la novedad para el objeto de las reivindicaciones 1-18, ya que se relacionan con las preparaciones del virus de la parainfluenza (PIV):

- D1 revela una vacuna dividida, que comprende el virus de la parainfluenza (PIV) (ver reivindicaciones 1, 2, 14-17, y la página 3, líneas 35-38).

- D3 se refiere a las vacunas de las preparaciones del virus de la parainfluenza que habían sido divididas por medio de la adición de un detergente (ver la columna 2, líneas 37-62, columna 3, líneas 1-3 y 64-68, y las reivindicaciones).
 - D4 se refiere a vacunas de virus dividido que comprenden, por ejemplo, preparaciones del virus de la parainfluenza.
 - D5 enseña la posibilidad de usar el detergente MESK para dividir el virus de la parainfluenza tipo 3, para obtener una vacuna dividida no infecciosa (ver resumen).
- 2.2 Las reivindicaciones 19-20 se relacionan con un método para producir una formulación de vacuna caracterizada únicamente por el paso de dividir un virus recubierto RSV. La división del virus RSV para una vacuna es bien conocida en la técnica. Por lo tanto, el método reivindicado es conocido y por lo tanto estas reivindicaciones no son novedosas (Artículo 33(2) PCT).
- 2.3 Las reivindicaciones 21-22 y 28-29, que se relacionan con el uso de vacunas divididas RSV tampoco son novedosas (Artículo 33(2) PCT), ya que sus características ya han sido reveladas en D1 (ver reivindicaciones, páginas 3-5 y Ejemplos), D2 (ver páginas 1 y 3), D3 (ver Ejemplos) y D4 (ver páginas 1-5).
- 2.4 Las reivindicaciones 23-26 se relacionan con un equipo, un dispositivo intranasal y con un método para proteger o tratar a un mamífero administrándole la vacuna de las reivindicaciones 1-18. Estas reivindicaciones son novedosas (Artículo 33(2) PCT), ya que dicha vacuna también se considera novedosa.
3. Nivel inventivo
- 3.1 En la técnica anterior no se menciona un equipo para administración de la formulación de la vacuna reivindicada. También la preparación de la vacuna de las reivindicaciones 1-18 parece ser más inmunogénica que las preparaciones que usan únicamente proteínas de membranas del virus. No se considera obvio para la persona experta considerar el tener un dispositivo para administración intranasal junto con esta nueva preparación ni un método de tratamiento que use estas vacunas nuevas.

No se menciona en la técnica anterior un posible aumento en la inmunogenicidad de la preparación RSV usando todo el virus. Por el contrario, se sugiere y prefiere el aislamiento de las proteínas de membrana.

Por lo tanto, las reivindicaciones 1-18 y 23-26 parecen comprender un nivel inventivo (Artículo 33(3) PCT).

4. Algunas objeciones para aclarar:

- El solicitante debe estar consciente del hecho de que el uso de expresiones como "opcionalmente" (reivindicación 19) no tiene un efecto limitante sobre el alcance de la reivindicación; es decir, la característica que sigue a dicha expresión debe considerarse como enteramente opcional (ver Lineamientos III-4.6)
- Las reivindicaciones 25-26 se refieren a una enfermedad y a un tratamiento de una enfermedad, sin mayor caracterización de dicha enfermedad. Estas reivindicaciones no son claras (Artículo 6 PCT).

5. Para la evaluación de las reivindicaciones presentes 25-26 (completamente) y 28-29 (parcialmente) respecto a la pregunta de si son industrialmente aplicables, no existen criterios unificados en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce como aplicable industrialmente el objeto de las reivindicaciones al uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, reivindicaciones de un compuesto conocido para un primer uso en el tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la fabricación de un medicamento para un tratamiento médico nuevo.

NOTA:

**EL CAPITULO REIVINDICATORIO ANEXO A LA
VERSION EN INGLES DEL REPORTE DE EXAMEN
PRELIMINAR INTERNACIONAL, ES EL CAPITULO
REIVINDICATORIO QUE SE ACOMPAÑA EN LA
PRESENTE SOLICITUD**

PATENT COOPERATION TREATY

File
36
33

From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To: Stephen, Robert, J. GLAXOSMITHKLINE Corporate Intellectual Property Two New Horizons Court Brentford Middlesex TW8 9EP GRANDE BRETAGNE		GlaxoSmithKline Corporate IP Received BRENTFORD - 4 DEC 2002		PCT NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT (PCT Rule 71.1)	
		ATTY: <u>IAS</u> IPM: <u>N/A</u> <u>ON</u> ATTY CHECKED: <u>AS</u>		ADMIN: <u>CA</u> UPDATED ON: <u>02.12.2002</u> Date of mailing: <u>02.12.2002</u> (day/month/year)	
Applicant's or agent's file reference RS/FL/B45243			IMPORTANT NOTIFICATION		
International application No. PCT/EP01/11328		International filing date (day/month/year) 01/10/2001		Priority date (day/month/year) 02/10/2000	
Applicant SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.					

1. The applicant is hereby notified that this International Preliminary Examining Authority transmits herewith the international preliminary examination report and its annexes, if any, established on the international application.
2. A copy of the report and its annexes, if any, is being transmitted to the International Bureau for communication to all the elected Offices.
3. Where required by any of the elected Offices, the International Bureau will prepare an English translation of the report (but not of any annexes) and will transmit such translation to those Offices.

4. REMINDER

The applicant must enter the national phase before each elected Office by performing certain acts (filing translations and paying national fees) within 30 months from the priority date (or later in some Offices) (Article 39(1)) (see also the reminder sent by the International Bureau with Form PCT/IB/301).

Where a translation of the international application must be furnished to an elected Office, that translation must contain a translation of any annexes to the international preliminary examination report. It is the applicant's responsibility to prepare and furnish such translation directly to each elected Office concerned.

For further details on the applicable time limits and requirements of the elected Offices, see Volume II of the PCT Applicant's Guide.

For the purpose of deciding whether the claimed invention is patentable or not, the elected Offices may apply criteria additional to or different from the criteria on which the international preliminary examination report is based (see Articles 27(5), 33(5)). Additional criteria may include e.g. exemptions from patentability and the requirements of enabling disclosure and of clarity and support of claims.

Name and mailing address of the IPEA/  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2369 - 0 Tlx 523656 epmu d Fax +49 89 2369 - 4485	Authorized officer Cleere, C Tel. +49 89 2369-7713	
---	--	---

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference RS/FL/B45243	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP01/11328	International filing date (day/month/year) 01/10/2001	Priority date (day/month/year) 02/10/2000
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K39/155		
Applicant SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.		

1. This International preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 8 sheets, including this cover sheet.

- ☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e. sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 4 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☒ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 05/04/2002	Date of completion of this report 02.12.2002
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2369 - 0 Tx 523856 epmu d Fax +49 89 2369 - 4465	Authorized officer BROCHADO GARGANTA, M Telephone No. +49 89 2369 8835 

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP01/11328

I. Basis of the report

1. With regard to the elements of the international application (*Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rules 70.16 and 70.17)*):

Description, pages:

1-36 as originally filed

Claims, No.:

1-29 as received on 30/10/2002 with letter of 29/10/2002

Drawings, sheets:

1/18-18/18 as originally filed

2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language: , which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of the international search (under Rule 23.1(b)).
☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
☐ the language of a translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
☐ filed together with the international application in computer readable form.
☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

4. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages:
☐ the claims, Nos.:

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP01/11328

☐ the drawings, sheets:

5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed (Rule 70.2(c)):

(Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.)

6. Additional observations, if necessary:

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

- ☐ the entire international application.
- ☒ claims Nos. 25-26(totally), 28-29 (partially).

because:

- ☒ the said international application, or the said claims Nos. 25-26(totally), 28-29(partially), with respect to industrial applicability relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):
see separate sheet
- ☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):
- ☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed.
- ☐ no international search report has been established for the said claims Nos. .

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

- ☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.
- ☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

IV. Lack of unity of invention

1. In response to the invitation to restrict or pay additional fees the applicant has:

- ☐ restricted the claims.

40
39

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP01/11328

- ☐ paid additional fees.
- ☐ paid additional fees under protest.
- ☐ neither restricted nor paid additional fees.
- 2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied and chose, according to Rule 88.1, not to invite the applicant to restrict or pay additional fees.
- 3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rules 13.1, 13.2 and 13.3 is
 - ☐ complied with.
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
- 4. Consequently, the following parts of the international application were the subject of international preliminary examination in establishing this report:
 - ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos. .

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-18, 23-26
	No:	Claims	19-22,27-29
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-18,23-26
	No:	Claims	19-22,27-29
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-24,27 (totally),28-29(partially)
	No:	Claims	

**2. Citations and explanations
see separate sheet**

41
38

Re Item I

Basis of the report

1. The amendments filed on 30.10.02 do not introduce additional subject-matter, which extends beyond the content of the application as filed. Therefore, the amendments meet the requirements of Article 34(2)(b) PCT.

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. Claims 25-26 (totally) and 28-29 (partially) are directed to a method of treatment of the human/animal body. They relate therefore to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject-matter of these claims (Article 34(4)(a)(i) PCT).

Re Item IV

Lack of unity of invention

1. The International Searching Authority found 2 (groups of) inventions in this international application (see ISR).

Re Item V

Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Reference is made to the following documents:

(D1) EP-A-0 864 646

(D2) GB-A-2 001 326

(D3) US-A-4 206 014

(D4) GB-A-1 486 557

(D5) DATABASE BIOSIS [Online] BIOSCIENCES INFORMATION SERVICE, PHILADELPHIA, PA, US; 1989 TRET'YAKOV YU K ET AL: 'SPLITTING OF PARAINFLUENZA VIRUS TYPE 3 AND THE EVALUATION OF SPLIT VACCINE IMMUNOGENIC ACTIVITY' Database accession no. PREV199090051148 XP002193127 & IZVESTIYA AKADEMII NAUK KAZAKHSKOI SSR SERIYA BIOLOGICHESKAYA, no. 6, 1989, pages 60-63, ISSN: 0002-3183

2. Novelty

2.1 The subject-matter of claim 1, relating to a vaccine formulation comprising a split enveloped RSV virus preparation, wherein the virus comprises viral membrane fragments, viral membrane envelope proteins, viral matrix and nucleoproteins, is new in the sense of Article 33(2) PCT, because a vaccine formulation having viral matrix and nucleoproteins is not disclosed in the prior art.

D2 discloses vaccines having parainfluenza virus or Respiratory Syncytial virus (RSV), wherein the virus preparation contains only isolated glycoproteins and is split by the addition of a cationic detergent (see page 1).

Dependent claims 2-18 are therefore also novel (Article 33(2) PCT).

Documents D1 and D3-D5 are not considered to be novelty destroying for the subject-matter of claims 1-18, as they relate to parainfluenza virus (PIV) preparations:

- D1 discloses a split vaccine, comprising parainfluenza virus (PIV) (see claims 1, 2, 14-17, and page 3, lines 35-38).

- D3 refers to vaccines of parainfluenza virus preparations which had been split by addition of a detergent (see column 2, lines 37-62, column 3, lines 1-3 and 64-68, and claims).
- D4 refers to split virus vaccines comprising, for example, parainfluenza virus preparations.
- D5 teaches the possibility of using the detergent MESK for splitting parainfluenza virus type 3, for obtention of a noninfectious split vaccine (see abstract).

2.2 Claims 19-20 relate to a method for producing a vaccine formulation only characterised by the step of splitting a RSV enveloped virus. The splitting of RSV virus for a vaccine is well known in the art. Thus, the claimed method is known and therefore these claims are not novel (Article 33(2) PCT).

2.3 Claims 21-22 and 28-29, relating to the use of RSV split vaccines are also not novel (Article 33(2) PCT), as their features are already disclosed in D1 (see claims, pages 3-5 and Examples), D2 (see pages 1 and 3), D3 (see Examples) and D4 (see pages 1-5).

2.4 Claims 23-26 relate to a kit, an intranasal device and to a method for protecting or treating a mammal by administering the vaccine of claims 1-18. These claims are novel (Article 33(2) PCT), as such a vaccine is also considered to be novel.

3. Inventive step

3.1 In the prior art, there is no mention to a kit for delivery of the claimed vaccine formulation. Also the vaccine preparation of claims 1-18 seem to more immunogenic than preparations using only membrane proteins of the virus. It is not considered to be obvious for the skilled person to consider to have an intranasal delivery device together with this new preparation nor a method of treatment using these new vaccines.

There is no mention in the prior art for a possible increase in the immunogenicity of

41

the RSV preparation by using the whole virus. In contrary, the isolation of membrane proteins is suggested and preferred.

Thus, claims 1-18 and 23-26 seem to involve an inventive step (Article 33(3) PCT).

4. Some clarity objections:

- The applicant should be aware of the fact that the use of expressions like "optionally" (claim 19) has no limiting effect on the scope of the claim; that is to say, the feature following such expression is to be regarded as entirely optional (see Guidelines III-4.6)

- Claims 25-26 refer to a disease and treatment of a disease, without further characterising said disease. These claims are not clear (Article 6 PCT).

5. For the assessment of the present claims 25-26 (totally) and 28-29 (partially) on the question whether they are industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claims. The EPO, for example, does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

Claims:

1. A vaccine formulation comprising a split enveloped RSV virus preparation, wherein the split enveloped virus preparation comprises viral membrane fragments, viral membrane envelope proteins, viral matrix and nucleoproteins.
2. A vaccine formulation as claimed in claim 1 wherein the vaccine preparation additionally comprises another split virus selected from the group consisting of: influenza virus, respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, metapneumovirus, measles virus, mumps virus, Epstein Barr virus, herpes virus, cytomegalovirus, dengue virus, yellow fever virus, tick-borne encephalitis virus, Japanese encephalitis virus, rubella virus, eastern, western and Venezuelan equine encephalitis viruses; and human immunodeficiency virus.
3. A vaccine formulation as claimed in claim 1 or 2 which additionally comprises one or more residual splitting agents.
4. A vaccine formulation as claimed in Claim 3 wherein the residual splitting agent is selected from the group consisting of: laureth 9, NaDOC, Sarcosyl group, Tween 80™ and Triton X100™.
5. A vaccine formulation according to Claim 4 wherein the residual splitting agent is NaDOC or Sarkosyl.
6. A vaccine formulation as claimed in any one of Claims 1 - 5 which additionally comprises a stabilising agent
7. A vaccine formulation as claimed in Claim 6 wherein the stabilising agent is a surfactant.
8. A vaccine formulation as claimed in claim 7 wherein the surfactant is either singly or a mixture of polyoxyethylene sorbitan monooleate (TWEEN80™), t-octylphenoxypolyethoxyethanol (TRITON X100™) and polyoxyethylene-9-lauryl ether.

AMENDED SHEET

9 A vaccine formulation as claimed in any one of the preceding claims wherein the vaccine is formulated to be delivered intranasally.

10 A vaccine formulation as claimed in any one of Claims 1 – 8 wherein the vaccine is formulated to be delivered intramuscularly or subcutaneously.

11 A vaccine formulation as claimed in any one of claims 1-8 wherein the vaccine is formulated to be delivered via the transdermal, intradermal, intra-epithelial or transcutaneous route.

12 A vaccine formulation according to claim 11, wherein the vaccine is formulated for intradermal delivery.

13 A vaccine formulation as claimed in any one of the preceding claims which additionally comprises an adjuvant.

14 A vaccine formulation according to claim 13 wherein the adjuvant is polyoxyethylene-9-lauryl ether.

15 A vaccine formulation according to claim 13 wherein the adjuvant is a preferential stimulator of TH1 cell response.

16 A vaccine formulation as claimed in claim 15 wherein the preferential stimulator of TH1-cell response is selected from the group of adjuvants comprising: 3D-MPL, QS21, a mixture of QS21 and cholesterol, a CpG oligonucleotide and combinations thereof.

17 A vaccine formulation according to claim 16 wherein the adjuvant is a vesicular adjuvant formulation comprising cholesterol, a saponin and an LPS derivative.

18 A vaccine formulation as claimed in any preceding claim which additionally comprises a carrier.

AMENDED SHEET

- 19 A method of producing a vaccine formulation as claimed in any one of the preceding claims which comprises the steps of
- (a) splitting an RSV enveloped virus;
 - (b) optionally admixing the split enveloped virus preparation with a stabilising agent; and
 - (c) optionally admixing the split enveloped virus preparation with an adjuvant.
- 20 A method of producing a vaccine formulation as claimed in Claim 19 wherein the split virus preparation is admixed with a stabilising agent, the stabilising agent comprising at least one surfactant selected from the group comprising polyoxyethylene sorbitan monooleate (TWEEN80™); t-octylphenoxypolyethoxyethanol (TRITON X100™); polyoxyethylene-9-lauryl ether.
- 21 Use of a split RSV vaccine preparation in the manufacture of a vaccine.
- 22 Use of a split RSV vaccine preparation in the manufacture of a vaccine formulation for the prophylaxis or treatment of disease.
- 23 A kit for delivery of an intranasal vaccine formulation as claimed in any one of claims 1 - 18 comprising:
- (a) a split RSV enveloped virus preparation; and
 - (b) an intranasal delivery device.
- 24 An intranasal delivery device comprising a split vaccine formulation according to any of claims 1-18.
- 25 A method for protecting or treating a mammal susceptible to, or suffering from disease caused by RSV, the method comprising administering an effective amount of a vaccine according to any of claims 1-18.
- 26 A method according to claim 25, wherein the vaccine is administered by intradermal or intranasal route.

AMENDED SHEET

- 27 Use of a split RSV vaccine preparation in the manufacture of a vaccine formulation for intranasal or intradermal delivery.
- 28 A formulation, method, use, kit, or device according to any preceding claim, wherein the vaccine formulation is immunogenic.
- 29 A formulation, method, use, kit, or device according to claim 28, wherein the vaccine formulation is immunogenic in both seropositive and seronegative individuals.

AMENDED SHEET

PREPARACIÓN DE VIRUS CON ENVOLVENTE DIVIDIDO

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5 La invención se refiere a formulaciones de vacuna que comprenden una preparación de virus con envolvente dividido en la que el virus es RSV o PIV, métodos para preparar tales formulaciones, y al uso de tales formulaciones en la prevención o tratamiento de la enfermedad.

10

15

20

25

30

PREPARACIÓN DE VIRUS CON ENVOLVENTE DIVIDIDO

CAMPO DE LA INVENCION

La presente invención se refiere a formulaciones de
5 vacuna novedosas, métodos para la elaboración de tales vacunas y al
uso de tales vacunas en la profilaxis o terapia de la enfermedad. En
particular, la presente invención se refiere a vacunas que comprenden
preparaciones de virus con envoltente dividido.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Un virus con envoltente es uno en el cual el núcleo de
virus se encuentra rodeado por una envoltente exterior rica en lípidos
con contenido de proteínas virales.

En una modalidad particular, el virus con envoltente
15 dividido de la formulación de vacuna de la presente invención se deriva
del virus sincitial respiratorio (RSV) o virus de la parainfluenza (PIV).
A manera de ejemplo, se describe específicamente el RSV.

El virus sincitial respiratorio humano es un miembro de la
familia Paramixoviridae de los virus y ocasiona enfermedades del
20 tracto respiratorio inferior, particularmente en niños pequeños y bebés.
Reportes recientes sugieren que RSV es también un patógeno
importante en adultos, particularmente los ancianos.

RSV es un virus con envoltente con un genoma de ácido
ribonucleico (ARN) de cepa negativa de 15,222 nucleótidos que
25 codifica para 11 ARNs mensajeros, codificando cada uno para un solo
polipéptido. Tres de las once proteínas son proteínas de superficie de
transmembrana: las proteínas G (unión), F (fusión) y SH. Una proteína
es la proteína de matriz de virión (M), tres proteínas son componentes
del nucleocápsido (N, P y L), y 2 proteínas son no estructurales (NS1 y

NS2). Hay dos proteínas adicionales M2-1 y M2-2. Existen dos sub-
grupos antigénicamente distintos de RSV, los subgrupos designados A
y B. La caracterización de las cepas de estos sub-grupos ha
determinado que las diferencias principales residen en las proteínas G,
5 mientras que se conservan las proteínas F.

El virus sincitial respiratorio (RSV) ocurre en las epidemias
de temporada, que alcanza un máximo durante el invierno en
ambientes templados y durante la temporada de lluvias en climas más
cálidos.

10 El RSV es una causa importante de serias enfermedades
del tracto respiratorio inferior en niños. Se calcula que 40-50% de los
niños hospitalizados con bronquiolitis y 25% de los niños
hospitalizados con neumonía se encuentran hospitalizados como
resultado directo de infecciones del RSV. La infección del RSV
15 primaria ocurre generalmente en niños menores al año de edad; 95%
de niños tienen evidencia serológica de infecciones anteriores a los
dos años de edad y 100% de la población la tienen en la edad adulta.

En infantes y niños pequeños, la infección progresa del
tracto respiratorio superior al inferior en aproximadamente 40% de los
20 casos y la presentación clínica es la de la bronquiolitis o la neumonía.
Los niños de dos a seis meses de edad se encuentran en gran riesgo
de desarrollar manifestaciones serias de la infección con el RSV
(principalmente fallas respiratorias); sin embargo, los niños de
cualquier edad con enfermedad cardíaca o pulmonar fundamental,
25 infantes prematuros, e infantes inmunocomprometidos, se encuentran
también en riesgo de serias complicaciones.

La reinfección sintomática ocurre a lo largo de la vida y se
ha vuelto crecientemente aparente que el RSV es también un
importante patógeno adulto, especialmente para los ancianos.

30 La infección del RSV es ciertamente casi subdiagnosticada

en adultos, en parte debido a que se considera que es una infección de niños. Consecuentemente, la evidencia del virus en adultos no se busca con objeto de explicar las enfermedades respiratorias. Además, el RSV es difícil de identificar en secreciones nasales provenientes de personas que tienen cierto grado de inmunidad parcial al virus, como la gran mayoría de adultos. Los adultos jóvenes hasta los adultos de edad media desarrollan típicamente un síndrome de tipo de resfriado persistente cuando se infecta con RSV. Las poblaciones envejecidas pueden desarrollar un síndrome respiratorio prolongado el cual es virtualmente indistinguible de la influenza, con síntomas respiratorios superiores los cuales pueden acompañarse por una intervención del tracto respiratorio inferior, incluyendo la neumonía. Las poblaciones envejecidas institucionalizadas son de particular preocupación, puesto que comprenden grandes números de personas susceptibles agrupadas conjuntamente. La dispersión de la infección a través de tal población, muchos de quienes tienen múltiples problemas médicos que pueden predisponerlos a un transcurso más severo de la enfermedad, es difícil de controlar.

Además, los reportes de estudios recientes que evalúan el impacto de la infección del RSV como una causa de hospitalización en adultos y ancianos saludables que residen en la comunidad abordan también un papel importante de la infección del RSV en enfermedades severas del tracto respiratorio inferior en estas poblaciones. Se ha identificado al RSV como uno de los cuatro patógenos más comunes que ocasionan enfermedades severas del tracto respiratorio inferior que dan como resultado la hospitalización de adultos. Se demostró también que las infecciones serias del RSV en personas ancianas no se limitan a sanatorios o situaciones de epidemia. En su lugar, la infección de RSV es una causa predecible de enfermedades serias entre pacientes ancianos que residen en la comunidad. De modo

53
50

similar a las hospitalizaciones para la influenza A, aquellos relacionados con infecciones del RSV se asociaron con una morbilidad substancial, como se evidencia por permanencias prolongadas en el hospital, proporciones altas de admisión de cuidado intensivo, y
5 proporciones altas de soporte ventilador.

Estos estudios abordan la necesidad médica y económica de una vacuna eficaz la cual pueda evitar complicaciones severas de infección de RSV en infantes, adultos y ancianos tal como los ancianos institucionalizados y los ancianos saludables que residen en la
10 comunidad. Consideraciones similares aplican igualmente para el PIV.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La presente invención proporciona una formulación de vacuna que comprende una preparación de virus con envoltente
15 dividido en la que el virus es el virus sincitial respiratorio o el virus de la parainfluenza.

De manera adecuada, la formulación de vacuna comprende además un excipiente farmacéuticamente aceptable.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

Las formulaciones de vacuna de la presente invención se derivarán a partir de virus con envoltentes que sean capaces de dividirse. El virus con envoltente puede derivarse a partir de una gran variedad de fuentes que incluyen virus de origen humano o animal. De
25 manera adecuada, el virus es RSVA, RSVB, PIV 1, PIV 2 o PIV 3. Donde el virus es de origen animal, la fuente es preferentemente bovina. Donde el virus es de origen animal, tal como de origen bovino, el virus es preferentemente un virus recombinante.

La formulación de vacuna de la invención comprende
30 opcionalmente otro virus dividido seleccionado a partir del grupo que

54
51

consiste en: virus de la influenza, virus sincitial respiratorio, virus de la parainfluenza, metaneumovirus, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de Epstein Barr, virus del herpes, citomegalovirus, virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis transmitida por garrapata, virus de la encefalitis Japonesa, virus de la rubéola, virus de la encefalitis equina occidental, oriental y Venezolana; y virus de la inmunodeficiencia humana.

La formulación de vacuna de la invención comprende opcionalmente un antígeno o antígenos derivados de patógenos en combinación con la preparación dividida, para proporcionar protección adicional contra la enfermedad. Los antígenos adecuados, los cuales no necesitan provenir de preparaciones de división, incluyen por ejemplo antígenos derivados de cualquiera de los virus listados anteriormente y patógenos que ocasionan enfermedades respiratorias tales como *Streptococcus Pneumoniae*.

Preferentemente, las formulaciones de vacuna de la presente invención son capaces de estimular una respuesta inmunológica protectora contra el virus con envoltente después del suministro.

La división del virus se lleva a cabo al interrumpir o fragmentar todo el virus, infeccioso (de tipo silvestre o atenuado) o no infecciosos (inactivado, por ejemplo), con una concentración de interrupción de un agente de división el cual es generalmente, pero no necesariamente, un agente tensioactivo. El virus a dividirse puede ser también un virus recombinante quimérico, que tiene elementos inmunogénicos derivados de más de un virus diferente. La interrupción da como resultado una solubilización completa o parcial de todas las proteínas de virus que altera la integridad del virus.

De manera adecuada, se obtiene un virus dividido al contactar el virus PIV o RSV con un agente de división de acuerdo con

la presente invención para interrumpir completamente la envoltente viral. Otras proteínas virales se vuelven preferentemente solubilizadas parcialmente o completamente. La pérdida de integridad después de la división hace no infecciosos al virus lo cual puede evaluarse por pruebas de concentración *in vitro* adecuadas. Una vez interrumpida la envoltente viral, las proteínas generalmente no se encuentran asociadas con viriones intactos completos. Otras proteínas virales son preferentemente solubilizadas parcialmente o completamente y por lo tanto no se encuentran asociadas, o solamente asociadas en parte, con viriones intactos completos después de la división.

El efecto del agente de división en la envoltente viral y las proteínas virales puede seguirse por la migración del virus dividido y de proteínas virales en experimentos de amortiguadores de sacarosa con visualización por análisis Western Blot y microscopía electrónica, como se describe en la presente.

La preparación de vacunas divididas de acuerdo con la invención puede involucrar los siguientes pasos de eliminación de los agentes de división y una parte o la mayoría del material lipídico viral. El proceso para la preparación del virus con envoltente dividido puede incluir además un cierto número de pasos de filtración diferente y/o otros pasos de separación tales como ultracentrifugación, ultrafiltración, centrifugación zonal y pasos cromatográficos en una variedad de combinaciones, y opcionalmente un paso de inactivación, por ejemplo, con formaldehído o β -propiolactona o tratamiento de UV que puede llevarse a cabo antes o después de la división. El proceso de división puede llevarse a cabo como un proceso por lotes, continuo o semi-continuo.

Las vacunas divididas de acuerdo con la invención contienen generalmente fragmentos de membrana y proteínas de envoltente de membrana así como también las proteínas de no

membrana tales como la proteína de matriz viral y la nucleoproteína en ausencia de viriones completos significativos. Las vacunas divididas de acuerdo con la invención contendrán generalmente la mayoría o todas las proteínas estructurales de virus aunque no necesariamente en las mismas proporciones que ocurren en todo el virus. Las preparaciones de virus dividido preferidas comprenden al menos la mitad del complemento de las proteínas estructurales virales, preferentemente todas esas proteínas. Por otra parte, las vacunas de subunidad consisten esencialmente de una o unas cuantas proteínas virales altamente purificadas. Por ejemplo, una vacuna de subunidad podría contener proteínas de superficie virales purificadas las cuales son conocidas por ser responsables de producir los anticuerpos deseados neutralizantes del virus después de la vacunación.

En esta invención pueden utilizarse diversos agentes de división tales como los agentes tensioactivos iónicos y no iónicos así como también otros diversos agentes reactivos. Los ejemplos de agentes de división útiles en el contexto de la invención incluyen:

1. Ácidos biliares y derivados de los mismos. Los ácidos biliares incluyen ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido cólico quenodesoxi, ácido litocólico, ácido ursodesoxicólico, ácido hiodesoxicólico y derivados de tipo glico-, tauro-, amidopropil-1-propanosulfónico, derivados de amidopropil-2-hidroxi-1-propanosulfónico de los ácidos biliares anteriormente mencionados, o N,N-bis(3Dgluconoamidopropil)desoxicolamida. Un ejemplo particular es el desoxicolato de sodio - NaDOC.

2. Los agentes tensioactivos no iónicos tales como octoxinóles (la serie Triton™), éteres de polioxietileno tales como monooleato de sorbitano de polioxietileno (Tween 80™), y éteres o ésteres de polioxietileno de la fórmula general (I):

(I) $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-A-R}$

53
54

donde n es 1-50, A es un enlace o -C(O)-, R es C₁₋₅₀ alquilo o fenil C₁₋₅₀ alquilo, y combinaciones de dos o más de estos. Los ejemplos particulares son; Tween 80™, Triton X-100™ y laureth 9;

3. Alquilglucósidos o alquiltioglucósidos, donde la
5 cadena de alquilo se encuentra entre C6-C18, típicamente entre C8 y C14, la mitad de azúcar es cualquier pentosa o hexosa o combinaciones de las mismas con diferentes enlaces, de tipo 1->6, 1->5, 1->4, 1->3, 1->2. La cadena de alquilo puede ser saturada, no saturada y/o ramificada;

10 4. Los derivados de 3 anteriormente citados, donde uno o más grupos hidróxilo, preferentemente el grupo hidróxilo 6 se modifica(n), como los ésteres, etoxilatos, sulfatos, éteres, carbonatos, sulfosuccinatos, isetionatos, etercarboxilatos, compuestos de amonio cuaternario;

15 5. Azúcares de acilo, donde la cadena de acilo se encuentra entre C6 y C18, típicamente entre C8 y C12, la mitad de azúcar es cualquier pentosa o hexosa o combinaciones de las mismas con diferentes enlaces, de tipo 1->6, 1->5, 1->4, 1->3, 1->2. La cadena de acilo puede ser saturada, no saturada y/o ramificada;

20 6. Las sulfobetainas de la estructura R-N,N-(R1,R2)-3-amino-1-propanosulfonato, donde R es cualquier cadena de alquilo o arilalquilo entre C6 y C18, típicamente entre C8 y C16. La cadena de alquilo R puede ser saturada, no saturada y/o ramificada. Las cadenas de alquilo de R1 y R2 entre C1 y C4, típicamente C1;

25 7. Las betainas de la estructura R-N,N-(R1,R2)-glicina, donde R es cualquier cadena de alquilo entre C6 y C18, típicamente entre C8 y C16. La cadena de alquilo puede ser saturada, no saturada y/o ramificada. R1 y R2 son cadenas de alquilo entre C1y C4, típicamente C1;

30 8. El polioxietilenoalquilléter de la estructura R-(-O-

CH₂-CH₂-)n-OH, donde R es cualquier cadena de alquilo entre C6 y C20 típicamente entre C8 y C14. La cadena de alquilo puede ser saturada, no saturada y/o ramificada. n se encuentra entre 5 y 30, típicamente entre 8 y 25;

- 5 9. N,N-dialquil-glucamidas, de la estructura R-(N-R1)-glucamida, donde R es cualquier cadena de alquilo entre C6 y C18, típicamente entre C8 y C12. La cadena de alquilo puede ser saturada, no saturada y/o ramificada o cíclica. R1 y R2 son cadenas de alquilo entre C1 y C6, típicamente C1. La mitad de azúcar puede modificarse
- 10 con pentosas o hexosas;

10. Hecameg: (6-O-(N-heptil-carbamoyl)-metil-alfa-D-glucopiranosida);

11. Alquilfenoxipolietoxietanol de la estructura R-C₆H₄-O-(-CH₂-CH₂-)n-OH, donde R es cualquier cadena de alquilo entre C6
- 15 y C18, típicamente C8. La cadena de alquilo puede ser saturada, no saturada y/o ramificada (n>=3);

12. Los compuestos de amonio cuaternarios de la estructura R, -N⁺ (-R1, -R2, -R3), donde R es cualquier cadena de alquilo entre C6 y C20, típicamente C20. La cadena de alquilo puede
- 20 ser saturada, no saturada y/o ramificada. R1, R2 y R3 son cadenas de alquilo entre C1 y C4, típicamente C1;

13. Sarcosilo: sal de Na de N-Laurilsarcosina;

14. CTAB (bromuro de amonio de trimetilo de cetilo) o Cetavlon.

- 25 Los más preferidos son NaDoc y Sarcosilo. Los agentes de división se incuban de manera adecuada a temperatura ambiente con el virus a dividirse, por ejemplo, durante toda la noche, para efectuar la división. Pueden utilizarse combinaciones de agentes de división, según sea apropiado.

30 La preparación de la vacuna dividida contiene

59
56

preferentemente al menos un agente tensioactivo que puede ser en particular un agente tensioactivo no iónico. El uno o más agentes tensioactivos puede(n) ser residual(es) del proceso de división, y/o agregarse al virus después de la división. Se considera que el material de antígeno de división se estabiliza en presencia de un agente tensioactivo no iónico, aunque se comprenderá que la invención no depende de esto siendo necesariamente el caso. Los agentes tensioactivos no iónicos estabilizadores adecuados incluyen los octoxínoles (la serie Triton™), éteres de polioxietileno tales como monooleato de sorbitano de polioxietileno (Tween 80™), y éteres o ésteres de polioxietileno de la fórmula general (I):



donde n es 1-50, A es un enlace o -C(O), R es C₁₋₅₀ alquilo o fenil C₁₋₅₀ alquilo, y combinaciones de dos o más de estos.

Los agentes tensioactivos no iónicos preferidos derivados de la serie Triton incluyen Triton X-100 (t-octilfenoxipolietoxietanol), Triton X-165, Triton X-205, Triton X-305 o Triton X-405, Triton N-101. Se prefiere particularmente Triton X-100.

Los agentes tensioactivos no iónicos preferidos incluyen además pero no se restringen a, éteres de polioxietileno de la fórmula general (I) anteriormente descrita, en particular: éter de polioxietilén-9-laurilo, éter de polioxietilén-9-estearilo, éter de polioxietilén-8-estearilo, éter de polioxietilén-4-laurilo, éter de polioxietilén-35-laurilo, y éter de polioxietilén-23-laurilo. Muy preferentemente, el éter de polioxietileno es éter de polioxietilén-9-laurilo (laureth 9). Los términos o nombres alternativos para éter de laurilo de polioxietileno se describen en el registro CAS. El número de registro de CAS de éter de polioxietilén-9-laurilo es: 9002-92-0. Los éteres de polioxietileno tales como éter de laurilo de polioxietileno se describen en el Manual Merck (12ª ed.: entrada 7717, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station,

60
57

N.J. EUA; ISBN 0911910-12-3). Se forma laureth 9 al hacer reaccionar óxido de etileno con alcohol de dodecilo, y tiene un promedio de nueve unidades de óxido de etileno.

Preferentemente, la concentración final de agente
5 tensioactivo estabilizador presente en la formulación de vacuna final se encuentra entre 0.001 a 20%, más preferentemente 0.01 a 10%, y muy preferentemente hasta aproximadamente 2% (p/v). Donde se encuentran presentes uno o más agentes tensioactivos, estos se encuentran generalmente presentes en la formulación final a una
10 concentración de hasta aproximadamente 2% cada uno, generalmente hasta una concentración de aproximadamente 1% cada uno, típicamente a una concentración de hasta aproximadamente 0.6% cada uno, y más típicamente en residuos de hasta aproximadamente 0.2% o 0.1% cada uno. Cualquier mezcla de agentes tensioactivos puede
15 estar presente en las formulaciones de vacuna de acuerdo con la invención.

El virus con envoltente puede producirse por réplica en una estructura celular adecuada, en suero o en un proceso sin suero. El virus de desarrollo de cultivo de tejidos puede producirse por
20 ejemplo en células humanas tales como MRC-5, WI-38, HEp-2 o células de simio tales como células AGMK, Vero, LLC-Mk₂, LLC-Mk2, FRhL, FRhL-2 o bovinas tales como MDBK, o células caninas tales como MDCK, o células primarias tales como fibroblastos de embrión de pollo, o cualquier otro tipo celular adecuado para la producción de un
25 virus para propósitos de vacuna que incluyen clones derivados de las líneas celulares anteriormente mencionadas.

La preparación de vacunas divididas se combina preferentemente con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables utilizados pueden ser
30 aquellos que son convencionales en el campo de preparación de

51
58

vacunas. Los excipientes utilizados en cualquier formulación de vacunas determinadas serán compatibles ambos uno con otro y con los ingredientes esenciales de la composición de tal manera que no haya interacción lo cual deterioraría el rendimiento de los ingredientes y los
5 agentes activos, si hay alguno. Todos los excipientes deben ser por supuesto no tóxicos y de una pureza suficiente para volverlos adecuados para uso humano. Son bien conocidos en la materia los ejemplos adecuados de excipientes.

La formulación de vacunas puede incluir también
10 preferentemente un adyuvante el cual puede ser un portador y/o un Inmunoestimulante. El adyuvante puede ser residual a partir del proceso de división, y/o agregarse al virus después de la división. Los adyuvantes adecuados para su uso en las vacunas de la presente Invención son bien conocidos en la materia.

15 Consecuentemente, un aspecto adicional de la presente invención proporciona una formulación vacuna que comprende una preparación de vacunas del virus sincitial respiratorio dividido o el virus de parainfluenza dividido en combinación con un adyuvante. De manera adecuada, la formulación comprende también un excipiente
20 farmacéuticamente aceptable.

La forma de adyuvante adecuada para su uso depende generalmente del medio de administración de la vacuna. Las preparaciones de vacuna de la presente invención pueden utilizarse para proteger o tratar un mamífero susceptible a, o que padece de
25 enfermedades, al administrar dicha vacuna a través de:

(a) una ruta mucosa, tal como la ruta oral/bucal/intestinal/vaginal/rectal o nasal;

(b) por suministro parenteral, por ejemplo, intramuscular, o administración subcutánea; o

30 (c) por suministro transdérmico, intradérmico, intra-epitelial

o transcutáneo.

La invención se extiende a tales métodos de tratamiento y protección.

Las preparaciones de vacuna de la presente invención
5 pueden administrarse opcionalmente por una combinación de las rutas listadas.

Suministro por la ruta mucosal

Aparte de pasar por alto el requisito de las inyecciones
10 dolorosas y el efecto negativo asociado en el acatamiento del paciente debido al "miedo a la aguja", la vacunación mucosal tal como por un método intranasal es atractiva dado que se ha mostrado en animales que la administración mucosal de antígenos tiene una buena eficacia para inducir respuestas protectoras en las superficies mucosales, la
15 cual es la ruta de entrada de muchos patógenos. En la vacunación, se ha sugerido que la vacunación mucosal, tal como la vacunación intranasal, pueda inducir inmunidad mucosal no solamente en la mucosa nasal, sino también en sitios mucosales distantes tales como la mucosa genital.

20 La administración intranasal de acuerdo con la invención puede estar en forma de gotitas, atomizador, o en polvo. Las formulaciones de vacuna nebulizadas o en aerosol forman parte también de esta invención. Las formulaciones entéricas tales como cápsulas gastro-resistentes y gránulos para la administración oral,
25 supositorios para la administración rectal o vaginal y ampollas para la administración bucal u oral también forman parte de esta invención.

Una ruta mucosal de administración preferida de la vacuna de la invención es a través de la ruta intranasal.

Puede utilizarse cualquier adyuvante adecuado para el
30 suministro intranasal, y en cualquier forma adecuada, tal como una

63
60

solución, una solución no vesicular, una suspensión o un polvo. Los adyuvantes preferidos incluyen aquellos ejemplificados en WO 99/52549 cuyo contenido completo se incorpora para referencia. Los adyuvantes preferidos incluyen, pero no se limitan a, agentes
5 tensioactivos no iónicos tales como Tween80™, Triton X-100™ y laureth 9, y combinaciones de los mismos.

Los agentes tensioactivos no iónicos pueden combinarse ventajosamente con un inmunoestimulante tal como un derivado no tóxico de lípido A que incluye aquellos descritos en US 4,912,094 y GB
10 2,220,211, incluyendo los derivados no tóxicos de lípido A de monofosforilo y difosforilo tal como lípido A de monofosforilo 3-de-O-acilado (3D-MPL) y lípido A de difosforilo 3-de-O-acilado. Una combinación preferida es Laureth-9 combinada con 3D-MPL. Los inmunoestimulantes anteriores pueden utilizarse también en
15 formulaciones sin agentes tensioactivos no iónicos, donde sea apropiado.

En una modalidad adicional de la presente invención, el adyuvante es una toxina ribosilante de ADP o mutante de la misma. Los ejemplos de tales toxinas son la Toxina Lábil de Calentamiento
20 (LT) derivada del E. coli, y mutantes de la misma tales como LTR192G, y fragmentos de estas toxinas tales como el componente de unión de gangliósido (LTB).

Los dispositivos preferidos para la administración intranasal de las vacunas de acuerdo con la invención son los
25 dispositivos atomizadores. Los dispositivos atomizadores nasales adecuados se encuentran comercialmente disponibles por Becton Dickinson, Pfeiffer GMBH y Valois.

Los dispositivos atomizadores preferidos para uso intranasal no dependen de su rendimiento en la presión aplicada por el
30 usuario. Los dispositivos de umbral de presión son particularmente

útiles debido a que el líquido se libera de la boquilla solamente cuando se alcanza una presión de umbral. Estos dispositivos hacen más fácil lograr un atomizador con un tamaño de gotita regular. Los dispositivos de umbral de presión adecuados para su uso con la presente invención son conocidos en la materia y se describen por ejemplo en WO 91/13281 y EP 311 863 B. Tales dispositivos se encuentran actualmente disponibles por Pfeiffer GMBH y se describen también en Bommer, R. Advances in Nasal drug delivery Technology, Pharmaceutical Technology Europe, Septiembre de 1999, p26-33.

10 Los dispositivos intranasales preferidos producen gotitas (medidas utilizando agua como el líquido) en el rango de 1 a 500 μm . Debajo de 10 μm existe un riesgo de inhalación, por lo tanto es deseable tener no más de aproximadamente 5% de gotitas debajo de los 10 μm .

15 El suministro de bi-dosis es una característica preferida adicional de un sistema de suministro intranasal para su uso con las vacunas de acuerdo de acuerdo con la invención. Los dispositivos de bi-dosis contienen dos subdosis de una sola dosis de vacuna, una subdosis para la administración a cada fosa nasal.

20 La invención proporciona en un aspecto adicional un juego farmacéutico que comprende un dispositivo de administración intranasal como se describe en la presente que contiene una formulación de vacuna de acuerdo con la invención o que comprende un dispositivo de administración intranasal y una formulación de 25 vacuna separada para su uso con ese dispositivo. La invención proporciona también un dispositivo de suministro intranasal que comprende una formulación de vacuna dividida de la presente invención.

Este aspecto de la invención no se limita necesariamente 30 para atomizar el suministro de formulaciones líquidas. Las vacunas de

acuerdo con la invención pueden administrarse en otras formas, por ejemplo, como polvo.

Las vacunas de la presente invención pueden administrarse también a través de la ruta oral. En tales casos, el
5 excipiente farmacéuticamente aceptable puede incluir también reguladores alcalinos, cápsulas entéricas, microgránulos y/o tener forma de ampollas.

Las vacunas de la presente invención pueden determinarse también por la ruta vaginal. En tales casos, los excipientes
10 farmacéuticamente aceptables pueden incluir también emulsores, polímeros tales como CARBOPOL®, y otros estabilizadores conocidos de cremas y supositorios vaginales. Las vacunas de la presente invención pueden administrarse también por la ruta rectal. En tales
15 casos, los excipientes pueden incluir también ceras y polímeros conocidos en la materia de formación de supositorios rectales.

Rutas Parenterales

Además, las vacunas de la presente invención pueden suministrarse parenteralmente, por ejemplo, por administración
20 intramuscular, o subcutánea. En esta circunstancia, se prefiere un adyuvante el cual es un estimulante preferencial de una respuesta de TH-1.

Una respuesta inmunológica puede distinguirse ampliamente en dos categorías, siendo una respuesta inmunológica
25 humoral (anticuerpos) o mediada por células (CTLs, células auxiliares T, células NK). Tanto en ratones como en humanos, los subconjuntos de células auxiliares T (Th) funcionalmente distintas, conocidas como células Th1 y Th2 se caracterizan por los patrones de citoquinas que producen. Históricamente, las respuestas inmunológicas humorales y
30 mediadas por células se han asociado con las respuestas de tipo Th2 y

las respuestas de tipo Th1, respectivamente. Estas dos formas polarizadas de la respuesta inmunológica celular específica proporcionan un modelo útil para explicar los diferentes mecanismos ejecutores involucrados en la protección contra diversos patógenos.

- 5 Las respuestas predominantes de Th1 son eficaces en la erradicación de los agentes infecciosos, incluyendo los patógenos intracelulares. Las respuestas de Th2 contribuyen a la protección contra las formas extracelulares de los patógenos.

La distinción de las respuestas Inmunológicas de tipo Th1
10 y Th2 no es absoluta. En realidad, un individuo puede soportar una respuesta inmunológica que se describa por ser predominantemente Th1 o predominantemente Th2. El mecanismo por el cual las células TH son responsables para la dicotomía Th1/Th2 se describió primeramente en ratones cuando Mosmann y colegas proporcionaron
15 evidencia de que la estimulación de antígeno de las células Th dio como resultado el desarrollo de patrones restringidos y con estereotipos de producción citoquina (Mosmann, T.R. y Coffman, R.L. (1989) TH1 y TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. Annual Review of Immunology, 7,
20 p145-173). En el sistema murino, las células Th1 producen citoquinas tales como IFN- γ y mejoran la activación de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y la hipersensibilidad de tipo retrasado. Las células Th1 se encuentran involucradas también en la regulación de la producción de anticuerpos de IgG2a. Las células murinas Th2
25 producen citoquinas tales como IL-4 e IL-5 y se encuentran involucradas en la regulación de las respuestas humorales; más específicamente los Isotipos IgG1 e IgE.

Se conoce que algunos adyuvantes de vacuna son particularmente adecuados para la estimulación de respuestas de tipo
30 Th1 o Th2. Tradicionalmente, los mejores indicadores del balance

67
64

Th1:Th2 de la respuesta inmunológica después de una vacunación o infección incluyen la medición de los isotipos de anticuerpo de antígeno específico, tales como la proporción IgG2a:IgG1 en ratones.

Consecuentemente, un adyuvante de tipo Th1 es uno que
5 estimula las poblaciones de células T de antígeno de vacuna específico para producir niveles altos de citoquinas de tipo Th1. También induce respuestas de Inmunoglobulina de antígeno específico asociadas con isotipos de tipo Th1 (tal como IgG2a) en ratones.

Los adyuvantes que son capaces de estimulación
10 preferencial de la respuesta de células TH1 se describen en la Solicitud de Patente Internacional No. WO 94/00153 y WO 95/17209.

El lípido A de monofosforilo 3-De-O-acilado (3D-MPL) es uno de tales adyuvantes. Esto se sabe a partir de GB 2220211 (Ribi). Químicamente es una mezcla de lípido A de monofosforilo 3-De-O-
15 acilado con 4, 5 o 6 cadenas aciladas y se elabora por Corixa Montana. Una forma preferida de lípido A de monofosforilo 3-De-O-acilada se describe en la Patente Europea 0 689 454 B1 (SmithKline Beecham Biologicals SA).

Preferentemente, las partículas de 3D-MPL son lo
20 suficientemente pequeñas para filtrarse estériles a través de una membrana de 0.22 micrones (como se describe en la Patente Europea número 0 689 454). 3D-MPL se encontrará presente en el rango de 10 µg-100µg preferentemente 25-50 µg por dosis en la que el antígeno se encontrará típicamente presente en un rango de 2-50 µg por dosis.

25 Otro adyuvante preferido comprende QS21, un fragmento purificado de Hplc derivado de la corteza de Quillaja Saponaria Molina. Opcionalmente esta puede mezclarse con lípido A de monofosforilo 3-De-O-acilado (3D-MPL), opcionalmente junto con un portador.

El método de producción de QS21 se describe en la
30 Patente de E.U. No. 5,057,540.

68
65

Las formulaciones de adyuvantes no reactogénicos que contienen QS21 se han descrito con anterioridad (WO 96/33739). Tales formulaciones que comprenden QS21 y colesterol han mostrado ser exitosos adyuvantes estimulantes de Th1 cuando se formulan
5 conjuntamente con un antígeno. Consecuentemente, las composiciones de vacuna que forman parte de la presente invención pueden incluir una combinación de Qs21 y colesterol.

Los adyuvantes adicionales que son estimulantes preferenciales de respuesta de células TH1 incluyen oligonucleótidos
10 inmunomoduladores, por ejemplo, secuencias de CpG no metiladas como se describe en WO 96/02555.

Las combinaciones de diferentes adyuvantes estimulantes de TH1, tales como aquellas mencionadas con anterioridad, se contemplan también proporcionando un adyuvante el cual es un
15 estimulante preferencial de respuesta celular TH1. Por ejemplo, QS21 puede formularse conjuntamente con 3D-MPL. La proporción de QS21:3D-MPL se encontrará típicamente en el orden de 1:10 a 10:1; preferentemente 1:5 a 5:1 y frecuentemente substancialmente 1:1. El rango preferido para la sinergia óptima es 2.5:1 a 1:1 de 3D-
20 MPL:QS21.

En una modalidad preferida de la presente invención, la formulación de vacuna comprende una formulación de adyuvante vesicular que comprende colesterol, una saponina y un derivado de LPS. Sobre este aspecto, la formulación de adyuvante preferida
25 comprende una vesícula unilamelar que comprende colesterol, que tiene una bicapa lipídica que comprende preferentemente colina de fosfatidilo de dioleoil, en la que la saponina y el derivado de LPS se encuentran asociados con, o incorporados dentro de la bicapa lipídica. Más preferentemente, estas formulaciones de adyuvante comprenden
30 QS21 como la saponina, y 3D-MPL y el derivado de LPS, en el que la

proporción de QS21:colesterol va desde 1:1 a 1:100 peso/peso, y muy preferentemente 1:5 peso/peso. Tales formulaciones de adyuvante se describen en EP 0 822 831 B, cuya descripción se incorpora en la presente para referencia.

5 Preferentemente, también se encuentra presente un portador en la composición de vacunas de acuerdo con la invención. El portador puede ser una emulsión de aceite en agua, estructuras lípidas tales como liposomas o colonias micelares o una sal de aluminio, tal como fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio.

10 Una emulsión preferida de aceite en agua comprende un aceite capaz de metabolizarse, tal como escualeno, alfa tocoferol y Tween 80. Además, la emulsión de aceite en agua puede contener Span 85 y/o lecitina y/o tricaprilina.

15 En un aspecto particularmente preferido, los antígenos en la composición de la vacuna de acuerdo con la invención se combinan con 3D-MPL y alumbre.

20 La administración en humanos de QS21 y 3D-MPL, típicamente se presentará en una vacuna en el rango de 1µg - 200µg, tal como 10-100µg, preferentemente 10µg- 50µg por dosis. El aceite en agua típicamente comprenderá escualeno desde 2 hasta 10%, alfa tocoferol desde 2 hasta 10% y Tween 80 desde 0.3 hasta 3%. Preferentemente, la proporción de escualeno: alfa tocoferol es igual a o menor que 1 dado que éste proporciona una emulsión más estable. El Span 85 puede también estar presente a un nivel de 1%. En
25 algunos casos puede ser ventajoso que las vacunas de la presente invención contengan además un estabilizador.

30 Las emulsiones no tóxicas de aceite en agua contienen preferentemente un aceite no tóxico, por ejemplo escualano, escualeno, y emulsor, por ejemplo Tween 80, en un portador acuoso. El portador acuoso puede ser, por ejemplo, salmuera regulada con

fosfato.

Una formulación de adyuvante particularmente potente que involucra QS21, 3D-MPL y tocoferol en una emulsión de aceite en agua se describe en WO 95/17210.

5

Rutas transdérmicas, Intradérmicas, intra-epiteliales o transcutáneas.

La presente invención también puede utilizarse para inducir una respuesta inmunológica contra los antígenos virales cuando se aplican en la piel (suministro transdérmico, intradérmico, intra-
10 epitelial o transcutáneo). Esto incluye, pero no se limita a, parches (WO97/48440, WO98/28037, WO99/64580), cremas, suministro mediado por electroporación y suministro balístico tal como por gas comprimido. Los parches pueden incluir opcionalmente dispositivos para interrumpir la integridad de la piel.

15 El suministro intradérmico puede lograrse en humanos, por ejemplo, por la técnica convencional de inyección intradérmica, el "procedimiento Mantoux". Éste comprende los pasos para la limpieza de la piel, y después se estira con una mano, y con el bisel de una aguja de una medida estrecha (medida 26-31) orientada hacia arriba la
20 aguja se inserta en un ángulo de entre 10 – 15°. Una vez que se inserta el bisel de la aguja, se baja el barril de la aguja y se avanza adicionalmente mientras que se aplica una ligera presión para elevarlo bajo la piel. El líquido se inyecta después muy lentamente formando así una ampolla o chichón en la superficie de la piel, seguido por el
25 retiro lento de la aguja.

Puede utilizarse cualquier adyuvante adecuado con la vacuna de la presente invención para el suministro intradérmico. Preferentemente, el adyuvante comprende MPL, QS21 y colesterol. Preferentemente, el adyuvante intradérmico comprende una
30 formulación de adyuvante vesicular que comprende colesterol,

saponina y un derivado de LPS como se describe anteriormente con respecto a la administración parenteral. Para suministro transdérmico la vacuna puede también ser adyuvante mediante la adición de toxinas ribosilantes de ADP o mutantes de las mismas.

5 Se apreciará que cualquiera de los adyuvantes anteriores los cuales son adecuados para cualquiera de las rutas de vacunación descritas anteriormente pueden ser adecuados también para su uso a través de cualquier otra ruta, y tales combinaciones se incluyen específicamente e individualmente en la presente invención.

10 Las formulaciones de la presente invención pueden utilizarse para ambos propósitos profiláctico y terapéutico. Consecuentemente, la presente invención proporciona un método de tratamiento a un mamífero susceptible a o que padece de una enfermedad infecciosa, particularmente una infección del PIV o RSV o
15 enfermedades relacionadas con tales infecciones. El método comprende la administración al mamífero de una cantidad eficaz de una formulación de vacuna de acuerdo con la presente invención. En un aspecto adicional de la presente invención ésta proporciona una vacuna como se describe en la presente para su utilización en
20 medicina.

La preparación de la vacuna se describe en términos generales en New Trends and Developments in Vaccines, editado por Voller et al., University Park Press, Baltimore, Maryland, E.U.A. 1978.

25 Las vacunas pueden suministrarse en cualquier régimen de dosificación adecuado, tal como en regímenes de una dosis o de dos dosis. La vacuna puede utilizarse en poblaciones jóvenes e imprimadas.

Donde se emplea el suministro de IN, nosotros preferimos que la formulación comprenda un adyuvante y/o se entregue a
30 individuos ya imprimados por la exposición a RSV o PIV.

72
69

La presente invención se refiere adicionalmente a un método para producir una formulación de vacuna la cual comprende los pasos para:

- (a) dividir un virus con envoltente;
- 5 (b) mezclar opcionalmente la preparación del virus con envoltente dividido con un agente estabilizador; y
- (c) mezclar opcionalmente la preparación del virus con envoltente con un adyuvante (portador y/o Inmunoestimulante)

Preferentemente el virus es RSV o PIV.

- 10 Consecuentemente, el método comprende los pasos (a) y (b), (a) y (c), o (a) (b) y (c). Consecuentemente, el agente estabilizador que comprende al menos un agente tensioactivo seleccionado a partir del grupo que comprende monooleato de sorbitano de polioxietileno (TWEEN80™), t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X100™); éter de
- 15 polioxietileno-9-laurilo.

Opcionalmente la vacuna producida de esta manera se mezcla con un portador.

La presente invención se ilustra por, pero no se encuentra limitada a, los siguientes Ejemplos y Figuras, donde:

- 20 La Figura 1 ilustra un Western Blot de RSVA dividido con un anticuerpo anti F;

La Figura 2 ilustra un Western Blot de RSVA dividido con un anticuerpo anti M2;

- 25 La Figura 3 ilustra un Western Blot de RSVA dividido con un anticuerpo anti G;

La Figura 4 ilustra un Western Blot de RSVA dividido con un anticuerpo anti N;

La Figura 5 ilustra la materia prima de RSV/A visualizada por EM;

- 30 La Figura 6 ilustra RSV/A dividido con NaDOC visualizado

por EM;

La Figura 7 ilustra RSV/A dividido con Sarkosyl visualizado por EM;

La Figura 8 ilustra Concentraciones (Post II) de Anticuerpos de Anti-FG (ELISA) en ratones Imprimados inmunizados con RSV dividido por rutas intramuscular o intranasal;

La Figura 9 ilustra Concentraciones (Post II) de Anticuerpos Neutralizantes Anti-RSV/A en ratones imprimados inmunizados con RSV dividido por las rutas intramuscular o intranasal;

La Figura 10 ilustra las Respuestas de Isotipo de Anti-FG IgG (Post II) en ratones imprimados inmunizados con RSV dividido por rutas intramuscular o intranasal;

La Figura 11 ilustra las Concentraciones (Post I) Anticuerpos de Anti-FG (ELISA) en ratones Imprimados Inmunizados con RSV dividido por rutas intramuscular o intranasal;

La Figura 12 ilustra las Concentraciones de Anticuerpos (ELISA) de Anti-FG en ratones no imprimados Inmunizados con RSV dividido por la ruta intramuscular;

La Figura 13 ilustra concentraciones de anticuerpos neutralizantes anti-RSV/A en ratones no imprimados inmunizados con RSV dividido por la ruta intramuscular;

La Figura 14 ilustra Respuestas de Isotipo de IgG Anti-FG en ratones no imprimados Inmunizados con RSV dividido por la ruta intramuscular;

La Figura 15 ilustra Concentraciones de Anticuerpos (ELISA) de Anti-FG en ratones no imprimados inmunizados con RSV dividido por la ruta intranasal;

La Figura 16 ilustra Concentraciones de Anticuerpos Neutralizantes Anti-RSV/A en ratones no imprimados Inmunizados con RSV dividido por la ruta intranasal;

24
71

La Figura 17 ilustra las Concentraciones de Anticuerpos (ELISA) Anti-FG en conejillos de Indias imprimados; inmunizados con RSV dividido por las Rutas Intradérmicas o Intramusculares; y

La Figura 18 ilustra Concentraciones de Anticuerpos Neutralizantes Anti-RSV/A en conejillos de Indias Imprimados inmunizados con RSV dividido por la ruta intradérmica.

10 Ejemplo 1 Generación de virus divididos.

Los virus con envoltentes derivados a partir de una variedad de familias de virus se dividen por la adición de agentes divididos tales como los agentes tensioactivos. La división se evalúa por la caracterización de la migración de los virus divididos en gradientes de sacarosa o amortiguadores con visualización por análisis de SDS-PAGE/Western blot y por examinación directa de productos virales divididos utilizando la evaluación de microscopía electrónica.

Los virus divididos descritos en estos ejemplos incluyen representantes de una variedad de familias de virus con envoltentes. Por ejemplo, se evalúan los miembros de la familia Paramixoviridae (virus sincitiales A y B, virus-3 de la parainfluenza, virus de las paperas, y sarampión), familia Togaviridae (virus de rubéola) y la familia Herpesviridae (virus de Epstein Barr, citomegalovirus, o virus de herpes simple).

El acto de interrupción de la partícula viral (división) se lleva a cabo por la adición de un agente de división tales como un agente tensioactivo en concentraciones solubilizadas en las preparaciones virales libres de células. En particular, los ácidos biliares y alquilglicósidos se utilizan como agentes tensioactivos. Los agentes tensioactivos, solos o en diversas combinaciones, se agregan e incuban para permitir que el proceso llegue a su término. Todos los

virus se almacenan pendientes de su evaluación por microscopía electrónica.

La evaluación de la división eficiente se lleva a cabo inicialmente utilizando gradiente de sacarosa o centrifugación de amortiguador. Brevemente, las muestras no tratadas o tratadas con agentes tensioactivos se aplican a gradientes/amortiguadores de sacarosa y los fragmentos analizados en geles de SDS-PAGE. La migración de todos los tipos de proteínas de virión en las fracciones solubles indica una división eficiente. Las muestras calcularon eficientemente la división por el análisis de sacarosa-SDS-PAGE se analizan adicionalmente por microscopía electrónica. Las muestras se visualizan utilizando técnicas convencionales de tefido negativo.

Se llevaron a cabo los siguientes experimentos de división específica en RSV y PIV.

15

1.1 Condiciones del cultivo celular.

Se replicaron RSV/A/Largo humano y PIV-3 de tipo silvestre en células VERO en un proceso libre de suero estacionario. Antes de la infección, las células VERO crecieron durante 4 días hasta lograr la confluencia. Las condiciones de producción de virus se adaptaron a cada virus: MOI 0.03, 4 días para RSV/A y MOI 0.01, 5 días para PIV-3 a 37 °C. El día de la cosecha, se recuperaron los fluidos celulares después de la lisis y la adición de estabilizadores y se almacenaron inmediatamente a -70 °C.

25

1.2 Purificación del Virus.

Después de la clarificación por centrifugación a 1000*g durante 10 min, las partículas de los virus se comprimieron a partir del sobrenadante por una precipitación de PEG 6000. El comprimido se volvió a suspender en Tris 50 mM-NaCl 50 mM-MgSO4 2 mM pH de 7.5

30

regulador seguido de un tratamiento de benzonasa. Esta solución se ultrafiltró en una membrana AGT de 500 kD contra 5 volúmenes de salmuera regulada con fosfato, se diafiltró después contra 5 volúmenes de regulador de fosfato pH de 7.5.

- 5 Se produjeron partículas virales Intactas como se confirma por EM y centrifugación en un amortiguador de sacarosa como se describe en la presente. Se determinó la concentración de proteína.

1.3 División del virus

- 10 Las partículas virales se dividieron por la adición de un agente de división a la preparación viral libre de células.

Para ser eficaz, un detergente debe utilizarse por encima de su concentración micelar crítica, cmc. Todos los detergentes se utilizaron en una concentración final superior a su valor cmc. Se
15 estudió la proporción D/P (proporción de detergente/proteína). Se alcanzó la división exitosamente con una proporción D/P 25, lo cual se prefiere.

Se utilizaron los siguientes detergentes a una concentración de 2% para dividir las partículas de virus; Desoxicolato
20 de Sodio, Sarkosyl, Plantacare y Laureth 9.

Después de la división, las soluciones se sometieron a diálisis contra el regulador de formulación (PO₄ 10 mM/NaCl 150 mM pH 7.5) para la extracción del exceso de detergente.

El proceso de división se resume a continuación:

25

RSV-A: Hoja de flujo de purificación de virus

Clarificación de la cosecha

***Centrifugación en un rotor Beckman JA10 a 3500 RPM (1000*g)
+4°C durante 10 mln.***

30

Sobrenadante clarificado

10% de precipitación de PEG 6000

1h30 a baja agitación a +4°C

- 5 Centrifugación a 3500 RPM (1000*g)-20 min**
Comprimido resuspendido en 50 mM de Tris – 50 mM de NaCl - 2mM
de MgSO4 pH de 7.5 regulador.

Tratamiento de benzonasa

- 10 A 125 unidad/ml**
Incubación mínima de 4 horas bajo agitación

ULTRAFILTRACIÓN: AGT – VAGE4A – 500 Kd – 420 cm²

- 5 vol contra PO4(na) 10 mM – 150 mM de NaCl pH de 7.5 seguido por**
15 5 volúmenes de 20 mM de PO4 (Na) pH de 7.5

División

- Adición de detergente => final al 2% - incubación O/N a temperatura**
ambiente bajo agitación baja

20

Clarificación

Filtración terminal en Sartopure 300 (GF2-filtro de profundidad 1.2 µm)

ULTRAFILTRACIÓN: eliminación de detergente – concentración

- 25 5 vol de 20 mM de PO4(Na) pH de 7.5**
después 5 vol de 10 mM de PO4(Na) / 150 mM de NaCl pH de 7.5

Masa dividida

1.4 Caracterización de virus dividido

Se determinó la integridad de virus iniciales y la calidad de división por ultracentrifugación en un amortiguador de sacarosa al 30% (1h a 50000 rpm en un rotor TL1000 Beckman). Se analizaron los
5 fragmentos por pruebas de manchado sanguíneo Western específicas; microscopía electrónica y la concentración de infectividad se realizó en algunos de estos fragmentos.

1.4.1 Ultracentrifugación:

10 Después de rellenar a la mitad un tubo de centrifugado con la solución de sacarosa al 30% (450 µl), la muestra (450 µl) a analizarse se colocó suave y cuidadosamente en este amortiguador de sacarosa, después se colocó durante 4 hora a 50,000 rpm a +4°C en un rotor Beckman TL100. Después de la centrifugación, se drenó el
15 tubo en 3 partes. La fase superior (300 µl) se refiere como el "sobrenadante". La fase intermedia (300 µl) es la fase de interfase entre la muestra y el amortiguador de sacarosa, llamado en la presente el "intermedio". La fase inferior (300 µl) es la solución inferior con el comprimido resuspendido cuando se ha llevado a cabo la
20 centrifugación en un virus entero; llamado el "comprimido".

Estos 3 fragmentos se analizaron adicionalmente.

1.4.2 Análisis de manchado sanguíneo Western:

Este análisis permite la integridad del virus a verificarse
25 (fracción de comprimido positivo) y la eficacia de la división a determinarse (adecuadamente, la fracción de sobrenadante positivo para todas o para la mayoría de las proteínas estructurales tales como las proteínas de envoltente).

Se utilizaron anticuerpos específicos para la
30 caracterización de proteínas virales específicas.

Para RSV-A, se analizaron los fragmentos de división y de no división para el contenido de la proteína anti F (proteína de superficie); proteína anti G (proteína de superficie); proteína anti N (nucleocápsida) y proteína anti M (matriz).

5 Para el virus PIV-3, se analizaron los fragmentos de división y de no división para su contenido de proteína HN con un anticuerpo monoclonal y el contenido de las proteínas F, M, HN con un anticuerpo policlonal.

10 1.4.3 Criterios para la división

La presencia de una señal positiva de Western Blot (WB) contra las cuatro proteínas probadas en el fragmento de comprimido y en ausencia de una señal en los otros dos fragmentos antes de la división sugiere la presencia de todo un virus intacto en la preparación
15 viral.

Se consideró eficaz la división cuando se interrumpió la envoltente, y se detectaron las proteínas de envoltente en el sobrenadante y/o fragmento intermedio. Para el RSV, la división fue eficaz cuando F o G, por ejemplo, en fragmentos S o M.
20 Preferentemente, F y G se ubicaron substancialmente en las capas S y/o M, y no en el comprimido.

1.5 Resumen de resultados:

Los resultados se muestran en las Figuras 1-4 para el
25 RSVA.

En todos los resultados de Western Blot, "División-O" significa el virus antes de la división. "S", "M" y "P" se refieren a las muestras de "Sobrenadante", "Intermedio" y "Comprimido" tomadas después de la ultracentrifugación en el amortiguador de sacarosa
30 respectivamente. La numeración de pistas es de izquierda a derecha.

Los volúmenes se refieren a la cantidad de muestra depositada en los geles de SDS-PAGE.

La Figura 1 ilustra un Western Blot del RSVA dividido
5 sondeado con mAb B4 (anti-F).

En el panel superior:

10

1	STD	10 µl
2	División-O	10 µl
3	División-O-S	10 µl
4	División-O-M	10 µl
5	División-O-P	10 µl
6	División DOC-S	10 µl
7	División DOC-M	10 µl
8	División DOC-P	10 µl
9	División sarco-S	10 µl
10	División sarco-M	10 µl
11	División sarco-P	10 µl

15

En el panel inferior:

1	STD	10 µl
2	Regulador muestra	10 µl
3	División-O-S	10 µl
4	División-O-M	10 µl
5	División-O-P	10 µl
6	División planta-S	10 µl
7	División planta -M	10 µl
8	División planta -P	10 µl
9	División laureth9-S	10 µl
10	División laureth9-M	10 µl
11	División laureth9-P	10 µl
12	STD	10 µl

La Figura 2 ilustra un Western Blot de RSVA sondeado con un monoclonal anti-M;

20 En el panel superior:

25

1	STD	10 µl
2	División-O	20 µl
3	División-O-S	20 µl
4	División-O-M	20 µl
5	División-O-P	20 µl
6	División DOC-S	20 µl
7	División DOC-M	20 µl
8	División DOC-P	20 µl
9	División sarco-S	20 µl
10	División sarco-M	20 µl
11	División sarco-P	20 µl

30

En el panel superior:

1	STD	10 µl
2	Regulador muestra	20 µl
3	División-O-S	20 µl
4	División-O-M	20 µl
5	División-O-P	20 µl
6	División planta-S	20 µl
7	División planta -M	20 µl
8	División planta -P	20 µl
9	División laureth9-S	20 µl
10	División laureth9-M	20 µl
11	División laureth9-P	20 µl

La Figura 3 ilustra un Western Blot de RSVA dividido sondeado con un anti-G monoclonal;

5

Panel superior:

Panel inferior:

10

1	STD	10 µl
2	División-O	20 µl
3	División-O-S	20 µl
4	División-O-M	20 µl
5	División-O-P	20 µl
6	División DOC-S	20 µl
7	División DOC-M	20 µl
8	División DOC-P	20 µl
9	División sarco-S	20 µl
10	División sarco-M	20 µl
11	División sarco-P	20 µl

1	STD	10 µl
2	Regulador muestra	20 µl
3	División-O-S	20 µl
4	División-O-M	20 µl
5	División-O-P	20 µl
6	División planta-S	20 µl
7	División planta -M	20 µl
8	División planta -P	20 µl
9	División laureth9-S	20 µl
10	División laureth9-M	20 µl
11	División laureth9-P	20 µl

15

La Figura 4 ilustra un Western Blot de RSVA dividido sondeado con un anti-N monoclonal;

Panel superior:

Panel inferior:

20

1	STD	10 µl
2	División-O	20 µl
3	División-O-S	20 µl
4	División-O-M	20 µl
5	División-O-P	20 µl
6	División DOC-S	20 µl
7	División DOC-M	20 µl
8	División DOC-P	20 µl
9	División sarco-S	20 µl
10	División sarco-M	20 µl
11	División sarco-P	20 µl

1	STD	10 µl
2	Regulador muestra	20 µl
3	División-O-S	20 µl
4	División-O-M	20 µl
5	División-O-P	20 µl
6	División planta-S	20 µl
7	División planta -M	20 µl
8	División planta -P	20 µl
9	División laureth9-S	20 µl
10	División laureth9-M	20 µl
11	División laureth9-P	20 µl

25

30

La presencia de una señal en el medio y los fragmentos de sobrenadante y difícilmente cualquier banda en el fragmento de comprimido después de la división para las proteínas F y G muestra

que la envoltura viral se interrumpió completamente. La presencia de una señal en todos los fragmentos para las proteínas N y M muestra la presencia de estas proteínas en las preparaciones de división. Estos resultados sugieren que los cuatro detergentes probados conducen a un virus de división de RSVA.

El análisis de las señales contra las cuatro proteínas en todos los fragmentos y en particular las señales comparativas contra las proteínas N y M después de la división en el medio y los fragmentos de sobrenadante sugiere que, en las condiciones probadas, NaDOC y Sarkosyl no conducen solamente a dividir el virus sino que también son capaces de interrumpir todas las estructuras virales y solubilizar las proteínas estructurales y no estructurales.

Se obtuvieron resultados similares con el PIV dividido.

NaDoc y Sarkosyl son agentes de división preferidos para todos los virus.

1.6 Concentraciones virales in vitro

La pérdida de integridad después de la división hace no infeccioso al virus. El análisis de la interrupción exitosa del RSVA y el PIV3 se muestra por la pérdida de 10^6 log o más en concentraciones virales después de la división.

1.7 Análisis de microscopía electrónica

El análisis de microscopía electrónica se llevó a cabo utilizando un método convencional de tinte negativo de dos pasos que utiliza fosfotungsteno de Na como agente contrastante (Hayat y Miller, 1990, Negative Staining, McGraw, ed. Hill). Se examinaron las rejillas para evaluar el patrón de tinte del material.

El análisis por microscopía electrónica del RSVA de división de NaDoc o Sarkosyl y de no división y preparaciones del virus

PIV3 apoya las observaciones realizadas por el análisis Western Blot. Para ilustrar los resultados, se muestran los datos de RSV. La Figura 5 ilustra el virus RSVA antes de la división. Las Figuras 6 y 7 muestran la división del virus RSVA con NaDOC o Sarkosyl 5 respectivamente.

El virus de no división (virus intacto incompleto) contuvo relativamente bien preservadas o ligeramente dañadas partículas virales y un poco de material amorfo. Los virus de división NaDoc o Sarkosyl mostraron que la apariencia de una dispersión heterogénea 10 de material amorfo, agregada en cierto grado, con pocas estructuras identificables derivadas de la envoltente viral u origen nucleoprotéico. Se obtuvieron datos similares con el PIV.

Ejemplo 2. Inmunogenicidad de vacunas divididas en ratones.

15 Las preparaciones de RSV y/o PIV divididas se utilizan como inmunógenos para vacunar ratones a fin de evaluar la inmunogenicidad de estas preparaciones. Brevemente, los ratones hembras de 8 semanas de edad se inmunizan con las preparaciones de vacunas. Se investigan las rutas parenterales, mucosales e ID de 20 inmunización. Los adyuvantes varían dependiendo de la ruta de administración. En todos los casos se incluye un control sin adyuvante. Se aplican dos dosis en un intervalo de varias semanas.

Dos semanas después de la dosis final, se sacrifican los animales y se enjuagan la sangre, las células de bazo, y/o los 25 enjuagues nasales. La respuesta inmunológica humoral de virus específico en suero se evalúa al probar el suero de ratón en pruebas de ELISA de virus específico. Además, el perfil de isotipo de la respuesta de anticuerpo se determina utilizando pruebas de isotipo específico. La presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero se 30 evalúa utilizando una prueba de neutralización de virus específico. La

inducción de una respuesta inmunológica local relevante puede evaluarse por la prueba de los anticuerpos neutralizantes en los enjuagues nasales o alternativamente la prueba de IgA de virus específico en los enjuagues nasales.

5 La inducción de las respuestas inmunológicas celulares de virus específico se evalúa por la estimulación in vitro de células de bazo cosechadas y medición de proliferación celular (captación de timidina tritiada) y/o secreción de IL-5 e IFN γ por las células estimuladas.

10 El impacto de las variables en el experimento puede evaluarse con atención específica pagada a la calidad y la magnitud de la respuesta inducida por las formulaciones divididas.

El RSV dividido se probó a manera de ejemplo.

15 2.1 Formulaciones de RSV dividido

La siguiente serie de experimentos ejemplifica que el RSV dividido induce una potente respuesta inmunológica cuando se administra por las rutas intramuscular (IM), intranasal (IN), o intradérmica (ID). Con objeto de reflejar con más precisión el estado
20 inmunológico sea de una población pediátrica (joven) o envejecida (imprimada), se evaluó la inmunogenicidad sea en animales imprimados o no imprimados y se demostró la inmunogenicidad en ambas poblaciones.

En el primer conjunto de los experimentos, se utilizaron
25 ratones Balb/c hembras de 8 semanas de edad para probar la inmunogenicidad de la preparación de RSV dividido administrada sea por rutas IM o IN. La imprimación se realizó por la administración de unidades de formación de placas 3×10^5 (pfu) de virus RSV vivos administrados intranasalmente en un volumen de 60 μ l ($2 \times 30 \mu$ l). Tres
30 semanas después de la imprimación, se vacunaron los animales con

antígeno dividido de RSV. La cuantificación del producto dividido de RSV se basó en un ELISA específico de proteína F de RSV el cual cuantifica la proteína F en el producto dividido comparada con una norma de proteína G recombinante. Los ratones del Grupo A se
5 inmunizaron con 2 dosis de antígeno dividido de RSV con contenido de 4.2 µg de proteína F en 100 µl administrada por la ruta intramuscular con un intervalo de 21 días. Los ratones del Grupo B se inmunizaron con 2 dosis de antígeno dividido de RSV con contenido de 4.2 µg de proteína F con un adyuvante de 50 µg de Al(OH)₃ administrados en 100
10 µl por la ruta intramuscular con un intervalo de 21 días. Los ratones del Grupo C se inmunizaron con una primera dosis de antígeno dividido de RSV con contenido de 2.7 µg de proteína F en 60 µl y una segunda dosis administrada 21 días después del antígeno dividido de RSV con contenido de 4 µg de proteína F en 60 µl por la ruta intranasal. Dos
15 semanas después de la última dosis se sacrificaron todos los animales y se evaluó la respuesta inmunológica.

Los resultados del experimento se resumen en las Figuras 8-18. Las primeras lecturas inmunológicas utilizadas para evaluar la respuesta Inmunológica fueron las pruebas ELISA las cuales miden el
20 total de Inmunoglobulina (Ig) de FG específico del RSV o los Isotipos de IgG de FG específico (IgG₁ e IgG_{2A}) presentes en los sueros de animales vacunados. En estas pruebas se envuelven platos de 96 cavidades con antígeno de FG de RSV recombinante y los sueros de animal se diluyen serialmente y se aplican a las cavidades envueltas.
25 El anticuerpo unido se detecta por la adición de una Ig, IgG₁, o IgG_{2A} de anti-ratón biotinillada, seguida de una amplificación con estreptavidina conjugada con peroxidasa. El anticuerpo unido se revela después de la adición de substrato de OPDA, seguida de tratamiento con 2N de H₂SO₄ y la medición de la densidad óptica (OD)
30 a 490 nm. La concentración de anticuerpo se calcula a partir de una

referencia que utiliza el software SoftMax (utilizando una ecuación de cuatro parámetros) y se expresa en EU/ml.

Además de las pruebas ELISA, se incluyeron las pruebas de neutralización para caracterizar adicionalmente la calidad de la respuesta inmunológica inducida por las inmunizaciones. Para la prueba de neutralización, se incubaron diluciones de dos pliegues de sueros animales con el virus RSV/A (3000 pfu) y complemento de conejillo de Indias durante 1 hora a 37°C en platos de cultivo de tejido de 96 cavidades. Las células Hep-2 (10^4 células/cavidad) se agregaron directamente a cada cavidad y se incubaron las placas durante 4 días a 37°C. Se aspiraron los sobrenadantes y se agregó una solución WST-1 comercialmente disponible a cada cavidad. Las placas se incubaron durante 18-24 horas adicionales a 37°C. La OD se monitoreó a 450 nm y la concentración se analizó por análisis de regresión lineal. La concentración reportada es el inverso de la dilución de suero lo cual dio como resultado una reducción del 50% de la OD máxima observada para células no infectadas.

La Figura 8 muestra los resultados obtenidos utilizando la lectura total de ELISA de Ig. En los ratones imprimados se indujo una potente respuesta de anticuerpo anti-FG por 2 vacunaciones con antígeno de RSV dividido administrado vía IM (Grupos A, B) o IN (Grupo C). Para la vacunación IM hubo una tendencia hacia la intensificación de la magnitud de la respuesta inmunológica tras el uso del adyuvante con $Al(OH)_3$.

Específicamente, la Figura 8 muestra las concentraciones (ELISA) del anticuerpo anti-FG (vacunación post secundaria) en ratones imprimados con RSV vivo e inmunizado con RSV dividido por las rutas intramuscular (IM) o intranasal (IN). El Grupo A recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido IM. El Grupo B recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido con coadyuvante de alumbre

IM. El Grupo C recibió 2 dosis de 2.7 y 4.0 µg respectivamente de RSV dividido IN.

La Figura 9 muestra los resultados de la prueba de neutralización para las muestras de la Figura 8. Se indujo una potente
5 respuesta de anticuerpo neutralizante de virus en estos animales imprimados sea por vacunación IM o IN con 2 dosis del producto RSV dividido y una tendencia similar para el aumento de la respuesta en el grupo adyuvante de alumbre como se observa con la lectura de ELISA.

Específicamente, la Figura 9 muestra las concentraciones
10 de anticuerpo Neutralizante Anti-RSV/A (vacunación post secundaria) en ratones imprimados con RSV vivo e inmunizados con RSV dividido por las rutas intramusculares (IM) o intranasales (IN). El Grupo A recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de IM de RSV dividido. El grupo B recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido con adyuvante de
15 IM de alumbre. El Grupo C recibió 2 dosis de 2.7 y 4.0 µg respectivamente de IN de RSV dividido.

La Figura 10 muestra los resultados del análisis de isotipos para las muestras de las Figuras 8 y 9. En animales imprimados intranasalmente se aumenta la proporción de IgG_{2a}:IgG₁ para comparar
20 con los datos subsecuentes (Figura 14) generados en ratones no imprimados, sugiriendo una tendencia hacia una respuesta de tipo más Th1 cuando se imprimen los ratones con el virus vivo (es decir, situaciones naturales en poblaciones envejecidas).

Específicamente, la Figura 10 muestra respuestas (ELISA)
25 de Isotipo Anti-Fg IgG (vacunación post secundaria) en ratones imprimados con RSV vivo e inmunizados con RSV dividido por las rutas intramusculares (IM) o intranasales (IN). El Grupo A recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de IM de RSV dividido. El grupo B recibió 2 dosis de 4.2 µg de cada una de RSV dividido con adyuvante de IM de alumbre.
30 El Grupo C recibió 2 dosis de 2.7 y 4.0 µg respectivamente de IN de

88
85

RSV dividido.

La Figura 11 demuestra que incluso después de una sola dosis de antígeno se genera una fuerte respuesta inmunológica en respuesta a la vacunación IM o IN con RSV dividido en poblaciones 5 Imprimadas. Consecuentemente, en las poblaciones Imprimadas el RSV dividido es un poderoso inmunogen que induce respuestas de anticuerpo de concentración alta después de cualquier vacunación IM o IN.

Específicamente, la Figura 11 muestra las concentraciones 10 (ELISA) de anticuerpo Anti-FG (vacunación post primaria) en ratones Imprimados con RSV dividido e inmunizados con RSV dividido por las rutas Intramusculares (IM) o Intranasales (IN). El Grupo A recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de IM de RSV dividido. El grupo B recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido con adyuvante de IM de 15 alumbre. El Grupo C recibió 2 dosis de 2.7 y 4.0 µg respectivamente de IN de RSV dividido.

El Grupo D solamente se imprimó y no recibió una vacunación – las concentraciones de anticuerpo reportadas para este grupo son los 21 días después de la imprimación.

20 En la segunda serie de experimentos se utilizaron ratones no imprimados para documentar el efecto de la dosis de antígeno y el adyuvante en la Inmunogenicidad del producto de RSV dividido. Los ratones se inmunizaron con contenido de antígeno RSV dividido 4.2 (dosis alta) o 0.42 µg (dosis baja) de proteína F administrada en 100 µl 25 por la ruta IM. Las formulaciones de RSV dividido IM en ambas dosis de antígeno se administraron sin adyuvante o se utilizó como adyuvante la adición de 50 µg de Al(OH)₃, o una formulación de adyuvante vesicular que comprende colesterol, 3dMPL y QS21 como se describe en EP0822831, referida en la presente como DQ 3dMPL. Un 30 grupo de control recibió todo el virus RSV purificado con contenido de

3.4 µg de proteína F administrada también en 100 µl por la ruta IM. A una segunda dosis de cada formulación (Idéntica toda a la primera inyección excepto todo el grupo de virus purificado el cual recibió una preparación con contenido de 4.2 µg de proteína F) se le administró IM
5 30 días después. Dos semanas después de la última dosis se sacrificaron todos los animales y se evaluó la respuesta inmunológica.

La Figura 12 resume la respuesta de Ig de FG específico en estos animales. Se indujo una potente respuesta inmunológica en animales inmunizados sea con dosis alta o baja de proteína F cuando
10 se utilizó DQ/3DMPL como adyuvante y se administró por la ruta IM. Los niveles inferiores de anticuerpo se indujeron por el alumbre utilizado como adyuvante o las formulaciones no utilizadas como adyuvante administradas por la ruta IM. En todos los casos hubo una respuesta de dosis aparente dado que la dosis de antígeno baja induce
15 niveles inferiores de anticuerpo que la dosis de antígeno alta. Los niveles de anticuerpo inducidos por la dosis alta de todo el virus fueron similares a lo inducidos por la dosis inferior de RSV dividido utilizando como adyuvante DQ/3DMPL.

Específicamente, la Figura 12 muestra concentraciones
20 (ELISA) de anticuerpo de Anti-FG (vacunación post secundaria) en ratones no Imprimados inmunizados con RSV dividido por la ruta intramuscular (IM). El Grupo A recibió 2 dosis de 0.42 µg cada una de RSV dividido. El grupo B recibió 2 dosis de 0.42 µg cada una de RSV dividido con adyuvante de alumbre. El Grupo C recibió 2 dosis de 0.42
25 µg cada una de RSV dividido con coadyuvante de DQ/3DMPL. El Grupo D recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido. El Grupo E recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido con coadyuvante de alumbre. El Grupo F recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido con coadyuvante de DQ/3DMPL. El Grupo G recibió 2 dosis de
30 3.4 y 4.2 µg respectivamente de virus RSV purificado completo.

80
87

Se obtuvieron resultados similares cuando se utilizó la lectura de neutralización de virus en las muestras de la Figura 12 (Figura 13). La Figura 13 muestra concentraciones de anticuerpo neutralizante Anti-RSV/A (vacunación post-secundaria) en ratones no imprimados inmunizados con RSV dividido por la ruta Intramuscular (IM). El Grupo A recibió 2 dosis de 0.42 µg cada una de RSV dividido. El grupo B recibió 2 dosis de 0.42 µg cada una de RSV dividido con adyuvante de alumbre. El Grupo C recibió 2 dosis de 0.42 µg cada una de RSV dividido con coadyuvante de DQ/3DMPL. El Grupo D recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido. El Grupo E recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido con coadyuvante de alumbre. El Grupo F recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido con coadyuvante de DQ/3DMPL. El Grupo G recibió 2 dosis de 3.4 y 4.2 µg respectivamente de virus RSV purificado completo.

El análisis de los isotipos de IgG inducidos por estas formulaciones (Figura 14) reveló que mientras las formulaciones sin adyuvante y con adyuvante de alumbre inducen una respuesta típicamente de tipo Th2 en ratones no imprimados, además de DQ/3DMPL a la formulación da como resultado un cambio hacia una respuesta más de tipo Th1 con una proporción creciente de IgG_{2a}:IgG₁. Esto es similar al perfil observado en animales imprimados vacunados con las formulaciones sin adyuvantes o con adyuvante de alumbre (Figura 10). Consecuentemente, en los ratones no imprimados la vacunación IM con RSV dividido induce respuestas de anticuerpo fuertes que pueden aumentarse por la adición de adyuvantes.

Específicamente, la Figura 14 muestra respuestas (ELISA) de isotipo de IgG anti-FG (vacunaciones post secundarias) en ratones no imprimados inmunizados con RSV dividido por la ruta Intramuscular (IM). El Grupo A recibió 2 dosis de 0.42 µg cada una de RSV dividido. El grupo B recibió 2 dosis de 0.42 µg cada una de RSV dividido con

adyuvante de alumbre. El Grupo C recibió 2 dosis de 0.42 µg cada una de RSV dividido con coadyuvante de DQ/3DMPL. El Grupo D recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido. El Grupo E recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido con coadyuvante de alumbre. El Grupo F recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido con coadyuvante de DQ/3DMPL. El Grupo G recibió 2 dosis de 3.4 y 4.2 µg respectivamente de virus RSV purificado completo.

Las Inmunizaciones similares se realizaron en ratones no imprimados por la ruta IN. En este caso, los ratones recibieron antígeno de RSV dividido con contenido de 2.4 µg de proteína F (suministrada en 60 µl – 2*30 µl) para la primera dosis. Para la segunda dosis suministrada 30 días después, los ratones recibieron antígeno de RSV dividido con contenido de 3.5 µg de proteína F. El RSV dividido IN se administró sea sin adyuvante o con adyuvante por adición de 5 µg de toxina lábil *E. coli* (LT) o con éter de polioxietilen-9-laurilo al 0.5% (en la presente "Laureth 9"). Se inmunizó un grupo de control intranasalmente con el virus RSV purificado completo con contenido de 2.0 µg de proteína F en la primera dosis y 3.5 µg de proteína F en la segunda dosis. Dos semanas después de la vacunación final se sacrificaron los animales y se evaluó la respuesta inmunológica.

Como se muestra en las Figuras 15 y 16, las respuestas de anticuerpo se inducen por las formulaciones IN en ratones no imprimados. Mientras la lectura de ELISA (Figura 15) sugiere que las respuestas a la vacunación IN son ligeramente más débiles que las inducidas por la IM, la lectura de neutralización (Figura 16) sugiere que la formulación IN de RSV dividido con adyuvante de LT es al menos tan buena como la IM para inducir anticuerpos neutralizantes y que las demás formulaciones son también comparables con la IM. Consecuentemente, en los ratones no imprimados el RSV dividido

administrado por la ruta IN también es inmunogénico.

Específicamente, la Figura 15 muestra las concentraciones (ELISA) de anticuerpo anti-FG (vacunación post secundaria) en ratones imprimados inmunizados con RSV dividido por las rutas Intranasal (IN) o intramuscular (IM). El Grupo A recibió 2 dosis de 2.4 y 3.5 µg cada una de RSV dividido IN. El grupo B recibió 2 dosis de 2.4 y 3.5 µg cada una de RSV dividido con adyuvante de Laureth 9 IN. El Grupo C recibió 2 dosis de 2.4 y 3.5 µg cada una de RSV dividido con coadyuvante de LT IN. El Grupo D recibió 2 dosis de 2.0 y 3.5 µg cada una de virus purificado completo IN. El Grupo E recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido IM.

La Figura 16 muestra las concentraciones de anticuerpo neutralizantes anti-RSV/A (vacunación post secundaria) en ratones no imprimados inmunizados con RSV dividido por las rutas Intranasal (IN) o intramuscular (IM). El Grupo A recibió 2 dosis de 2.4 y 3.5 µg cada una de RSV dividido IN. El grupo B recibió 2 dosis de 2.4 y 3.5 µg cada una de RSV dividido con adyuvante de Laureth 9 IN. El Grupo C recibió 2 dosis de 2.4 y 3.5 µg cada una de RSV dividido con coadyuvante de LT IN. El Grupo D recibió 2 dosis de 2.0 y 3.5 µg cada una de virus purificado completo IN. El Grupo E recibió 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido IM.

Se evaluó la inmunogenicidad del antígeno del RSV dividido cuando se administra por la ruta ID en conejillos de Indias. La viabilidad de inyección ID verdadera en esta especie se ha confirmado por la inyección de tinta de la India en la dermis y la examinación histológica de los tejidos (datos no mostrados). Nuevamente, en un esfuerzo por estimular el estado inmunológico encontrado en poblaciones envejecidas (es decir, Imprimado contra RSV), los conejillos de Indias de Hartley (5 por grupo) se imprimaron sea con el virus RSV vivo (5×10^6 pfu administrado IN en 100 µl –50µl/fosa nasal;

Grupos A-E) o con virus RSV completo purificado (con contenido de 6 µg de proteína F administrada IM en 100 µl; Grupos F-J). Se administraron dos dosis equivalentes de vacuna el Día 21 y el Día 42 después de la imprimación. Los Grupos A y F recibieron la
5 preparación de RSV dividido con contenido de 4.2 µg de proteína F administrada por la ruta ID. Los Grupos B y G recibieron la preparación del RSV dividido con contenido de 0.84 µg de proteína F administrada por la ruta ID. Los Grupos C y H recibieron la preparación del RSV dividido con contenido de 4.2 µg de proteína F
10 con adyuvante de DQ/3DMPL administrada por la ruta ID. Los Grupos D e I recibieron la preparación de RSV dividido con contenido de 0.84 µg de proteína F con adyuvante de DQ/3DMPL administrada por la ruta ID. Los Grupos E y J recibieron la preparación del RSV dividido con contenido de 4.2 µg de proteína F administrada por la ruta IM. Los
15 animales fueron sangrados 3 semanas después de la primera dosis de vacuna y 2 semanas después de la segunda dosis de vacuna y se evaluó la respuesta inmunológica.

Los resultados de este experimento se resumen en las Figuras 17 y 18. La Figura 17 muestra la respuesta inmunológica
20 específica de FG detectada en los sueros de conejillos de Indias durante el transcurso del experimento. LA ELISA de FG específico utilizada para las pruebas de conejillos de Indias fue similar a la ELISA de ratón en que las cavidades se envolvieron con FG recombinante y los sueros animales se diluyeron y aplicaron a las cavidades envueltas.
25 Sin embargo, en esta prueba el anticuerpo unido se detecta por con Ig anti-conejillo de India conjugada de peroxidasa de rábano picante, seguida de adición de substrato y revelación como se describió anteriormente. Para todos los grupos se observa una respuesta débil a la imprimación, que permite una observación clara de una respuesta
30 aumentada en la vacunación sea por la ruta ID o IM. Se observa

claramente un aumento después de la vacunación primaria y es evidente un aumento adicional después de la vacunación secundaria en todos los grupos excepto el Grupo H donde se han colocado las concentraciones en placas. Se observa un claro aumento en la magnitud de la respuesta tras la aplicación del adyuvante (Grupos C, D, H, I). No se observan efectos claros de la dosis de antígeno en este experimento y 1/5 de la dosis administrada por la ruta ID parece funcionar tan bien como una dosis completa administrada por la ruta IM incluso sin la aplicación del adyuvante. La Figura 18 que resume los datos de neutralización muestra tendencias similares. Consecuentemente, en una población imprimeada (sea imprimeada por infección de virus vivo o por la administración del virus completo purificado) una dosis sencilla de RSV dividido administrada por la ruta ID es fuertemente inmunogénica y esta respuesta puede aumentarse adicionalmente por una segunda dosis de vacuna.

Específicamente, la Figura 17 muestra las concentraciones (ELISA) de anticuerpo Anti-FG en conejillos de Indias imprimeados inmunizados con RSV dividido por las Rutas intradérmica (ID) o intramuscular (IM). Los Grupos A-E se imprimaron con el virus RSV vivo. Los Grupos F-J se imprimaron con el virus completo purificado. Para la vacunación de los Grupos A y F se recibieron 2 dosis de 0.84 µg cada una de RSV dividido ID. Los Grupos B y G recibieron 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido ID. Los Grupos C y H recibieron 2 dosis de 0.84 µg cada una de RSV dividido con adyuvante de DQ/3DMPL ID. Los Grupos D e I recibieron 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido con adyuvante de DQ/3DMPL ID. Los Grupos E y J recibieron 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido IM.

La Figura 18 muestra las concentraciones de anticuerpo neutralizante Anti-RSV/A en los conejillos de Indias imprimeados inmunizados con RSV dividido por las Rutas intradérmica (ID) o

98
92

intramuscular (IM). Los Grupos A-B se imprimaron con el virus RSV vivo. Los Grupos F-J se imprimaron con el virus completo purificado. Para la vacunación, los Grupos A y F recibieron 2 dosis de 0.84 µg cada una de RSV dividido ID. Los Grupos B y G recibieron 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido ID. Los Grupos C y H recibieron 2 dosis de 0.84 µg cada una de RSV dividido con adyuvante con DQ/3DMPL ID. Los Grupos D e I recibieron 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividida con adyuvante de DQ/3DMPL ID. Los Grupos E y J recibieron 2 dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido IM.

10 En resumen, estos experimentos han demostrado que el antígeno de RSV dividido es fuertemente inmunogénico tanto en poblaciones jóvenes como imprimadas. Además, estos experimentos han demostrado que el RSV dividido puede administrarse por una variedad de rutas que incluyen la Intramuscular, Intranasal e intradérmica y en todos los casos es inmunogénica. La adición de adyuvantes puede aumentar las respuestas de anticuerpos en algunos casos y/o inducir un cambio en el perfil de la respuesta de una respuesta de tipo Th2 a una de tipo Th1.

REIVINDICACIONES

1. Una formulación de vacuna caracterizada porque comprende una preparación del virus RSV con envoltente dividido en
5 el que la preparación del virus con envoltente dividido comprende fragmentos de membrana viral, proteínas de envoltente de membrana viral, matriz viral y nucleoproteínas.

2. Una formulación de vacuna según la reivindicación 1, caracterizada porque la preparación de vacuna comprende además otro
10 virus dividido seleccionado a partir del grupo que consiste en: virus de la influenza, virus sincitial respiratorio, virus de la parainfluenza, metaneumovirus, virus del sarampión, virus de las paperas, virus de Epstein Barr, virus del herpes, citomegalovirus, virus del dengue, virus de la fiebre amarilla, virus de la encefalitis transmitida por garrapata,
15 virus de la encefalitis Japonesa, virus de la rubéola, virus de la encefalitis equina occidental, oriental y Venezolana; y virus de la inmunodeficiencia humana.

3. Una formulación de vacuna según la reivindicación 1 o 2, caracterizada porque comprende adicionalmente uno o más
20 agentes de división residuales.

4. Una formulación de vacuna según la reivindicación 3, caracterizada porque el agente de división residual se selecciona a partir del grupo que consiste en: laureth 9, NaDOC, grupo Sarcosilo, Tween 80™ y Triton X100™.

25 5. Una formulación de vacuna según la reivindicación 4, caracterizada porque el agente de división residual es NaDOC o Sarkosyl.

6. Una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-5 caracterizada porque comprende además un
30 agente estabilizador.

97
94

7. Una formulación de vacuna según la reivindicación 6, caracterizada porque el agente estabilizador es un agente tensioactivo.

8. Una formulación de vacuna según la reivindicación 7, caracterizada porque el agente tensioactivo es solamente o una mezcla
5 de monooleato de sorbitano de polioxietileno (TWEEN80™), t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X100™) y éter de polioxietileno-9-laurilo.

9. Una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada porque la vacuna se
10 formula para suministrarse intranasalmente.

10. Una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 caracterizada porque la vacuna se formula para suministrarse intramuscularmente o subcutáneamente.

11. Una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-8 caracterizada porque la vacuna se formula para
15 suministrarse a través de la ruta transdérmica, intradérmica, intra-epitelial o transcutánea.

12. Una formulación de vacuna según la reivindicación 11, caracterizada porque la vacuna se formula para el suministro
20 intradérmico.

13. Una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada porque comprende además un adyuvante.

14. Una formulación de vacuna según la reivindicación 13, caracterizado porque el adyuvante es éter de polioxietileno-9-laurilo.
25

15. Una formulación de vacuna según la reivindicación 13, caracterizada porque el adyuvante es un estimulante preferencial de respuesta de células TH1.

30 16. Una formulación de vacuna según la reivindicación

98
95

15, caracterizada porque el estimulador preferencial de la respuesta de células TH1 se selecciona a partir del grupo de adyuvantes que comprende: 3D-MPL, QS21, una mezcla de QS21 y colesterol, un oligonucleótido de CpG y combinaciones de los mismos.

5 17. Una formulación de vacuna según la reivindicación 16, caracterizada porque el adyuvante es una formulación adyuvante vesicular que comprende colesterol, una saponina y un derivado LPS.

 18. Una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizada porque comprende además
10 un portador.

 19. Un método para producir una formulación de vacuna según cualquiera de las reivindicaciones precedentes caracterizado porque comprende los pasos para

- (a) dividir un virus con envoltente RSV;
- 15 (b) mezclar opcionalmente la preparación del virus con envoltente dividido con un agente estabilizador; y
- (c) mezclar opcionalmente la preparación del virus con envoltente dividido con un adyuvante

 20. Un método para producir una formulación de vacuna
20 según la reivindicación 19, caracterizado porque la preparación de virus dividido se mezcla con un agente estabilizante, comprendiendo el agente estabilizante al menos un agente tensioactivo seleccionado a partir del grupo que comprende monooleato de sorbitano de polioxietileno (TWEEN80™); t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON
25 X100™); éter de polioxietileno-9-laurilo.

 21. El uso de una preparación de vacuna de RSV dividido en la elaboración de una vacuna.

 22. El uso de una preparación de vacuna de RSV dividido en la elaboración de una formulación de vacuna para la
30 profilaxis o tratamiento de la enfermedad.

23. Un juego para el suministro de una formulación de vacuna intranasal según cualquiera de las reivindicaciones 1-18 caracterizado porque comprende:

5 (a) una preparación de virus con envoltente RSV dividido; y

(b) un dispositivo de suministro intranasal.

24. Un dispositivo de suministro intranasal caracterizado porque comprende una formulación de vacuna dividida según cualquiera de las reivindicaciones 1-18.

10 25. Un método para proteger o tratar un mamífero susceptible a, o que padece la enfermedad ocasionada por el RSV, caracterizado el método porque comprende administrar una cantidad eficaz de una vacuna según cualquiera de las reivindicaciones 1-18.

15 26. Un método según la reivindicación 25, caracterizado porque la vacuna se administra por la ruta intradérmica o intranasal.

27. El uso de una preparación de vacuna de RSV dividido en la elaboración de una formulación de vacuna para el suministro intranasal o intradérmico.

20 28. Una formulación, método, uso, juego, o dispositivo según cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizados porque la formulación de vacuna es inmunogénica.

25 29. Una formulación, método, uso, juego, o dispositivo según la reivindicación 28, caracterizados porque la formulación de vacuna es inmunogénica tanto en individuos seropositivos como seronegativos.

Fig. 1

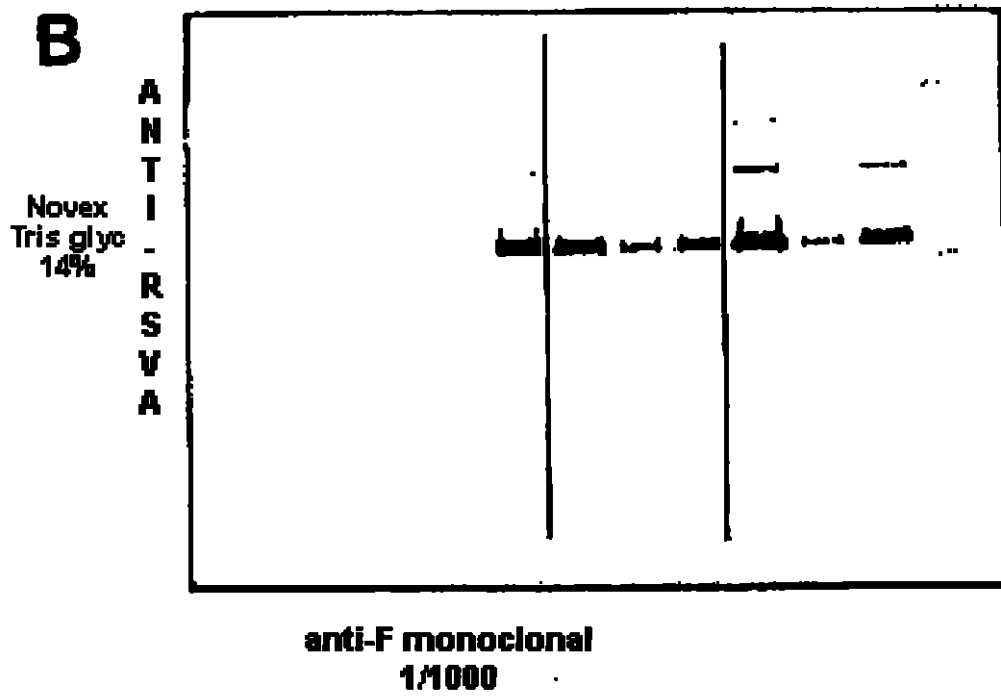
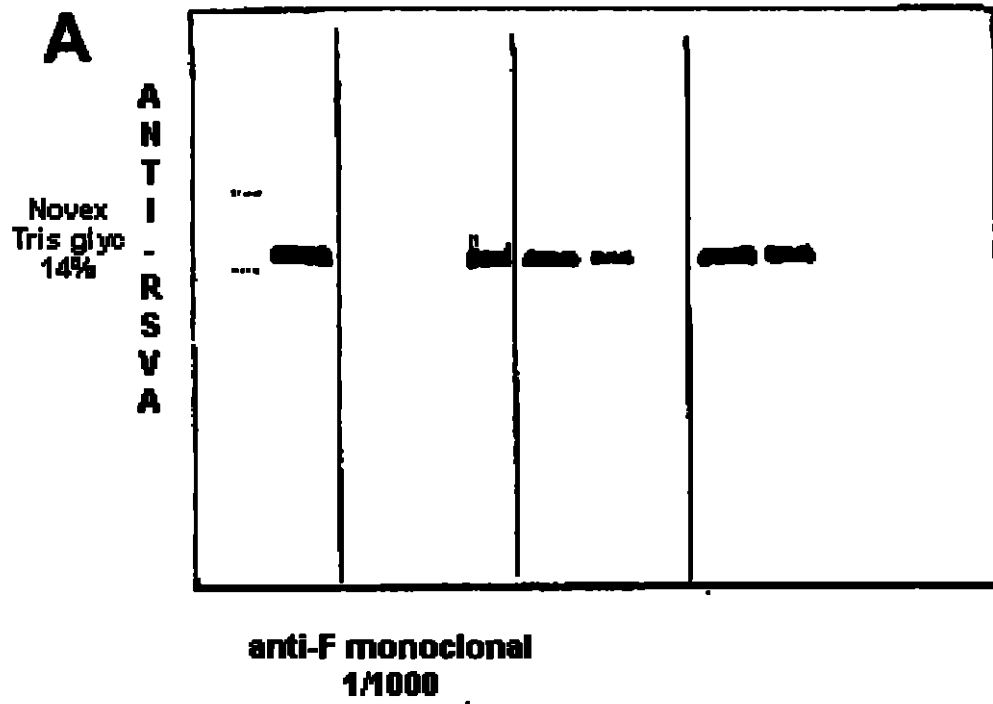


Fig. 2

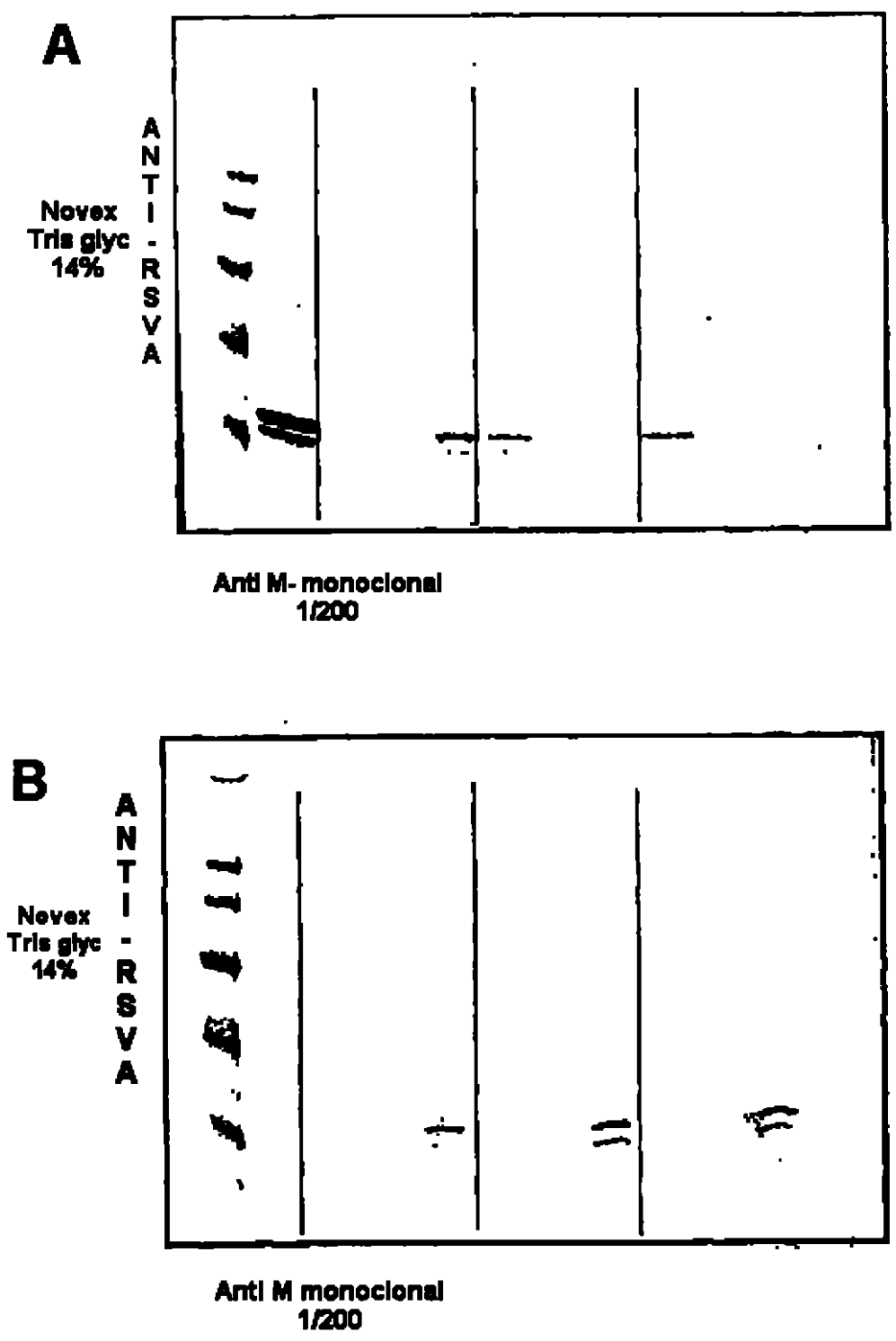


Fig.3

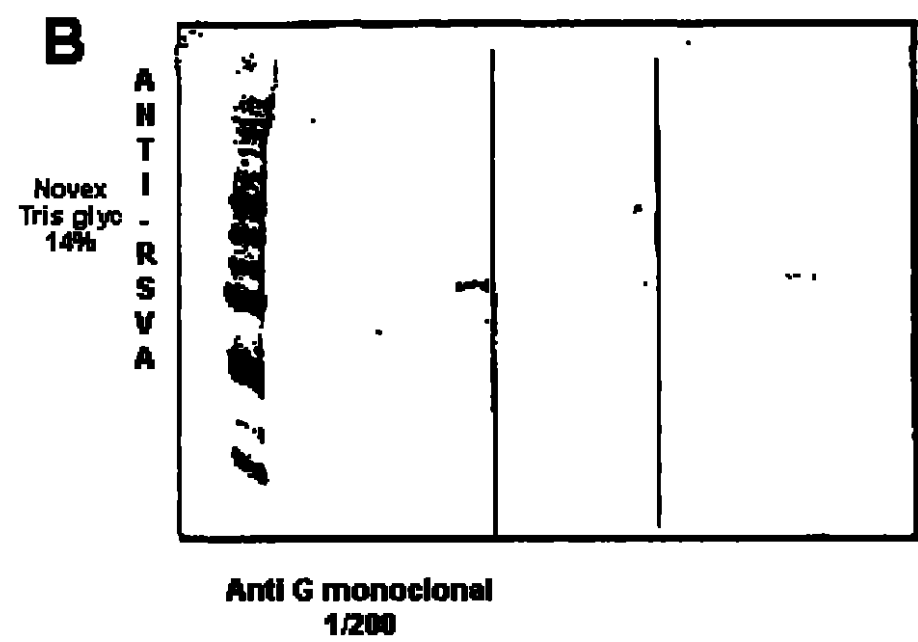
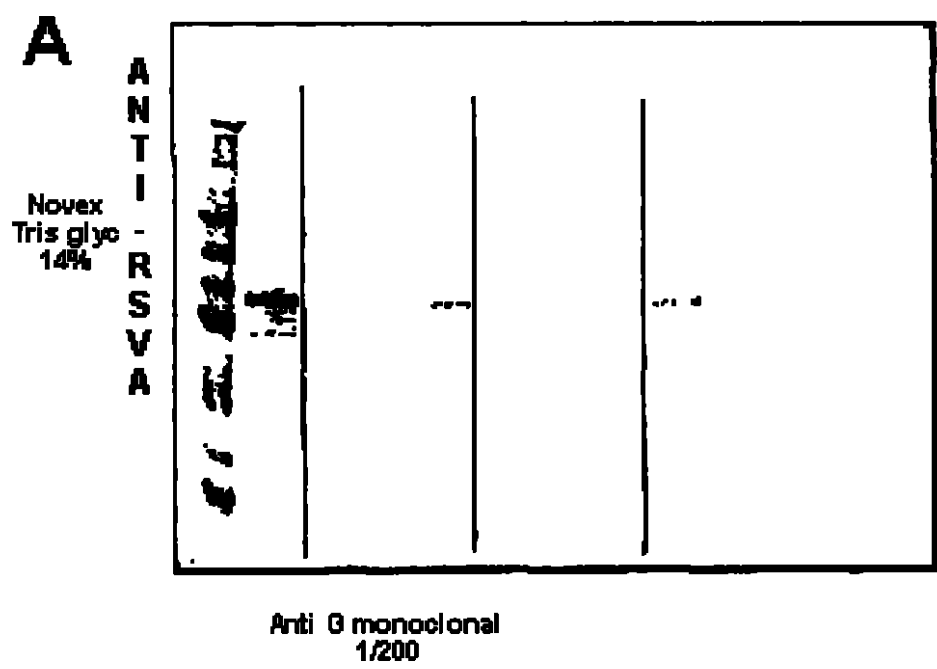
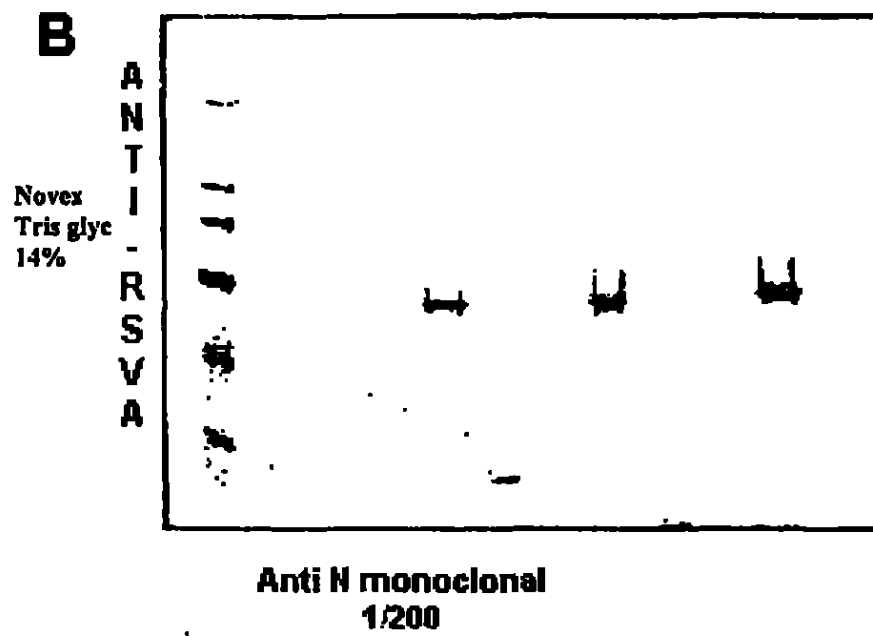
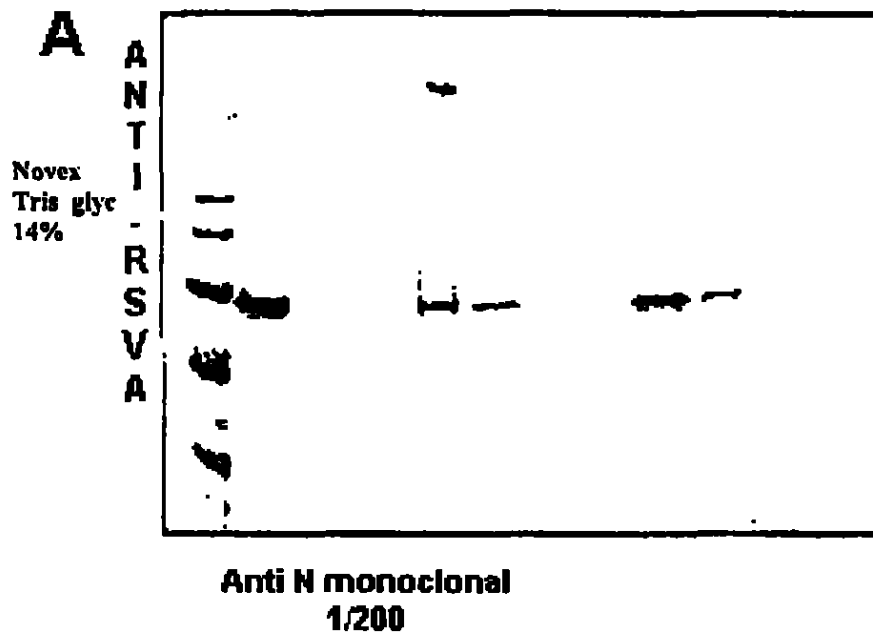


Fig. 4

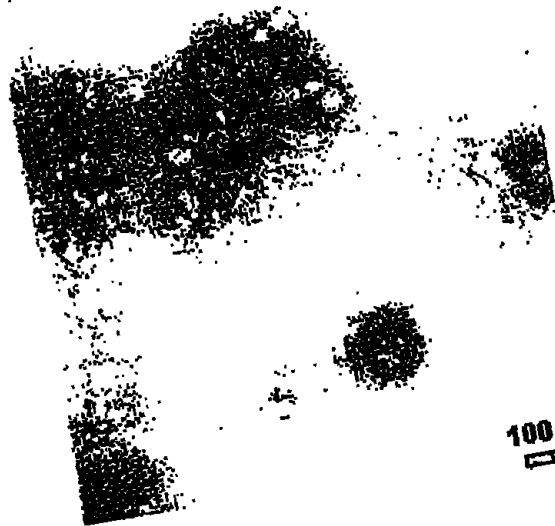


5/18

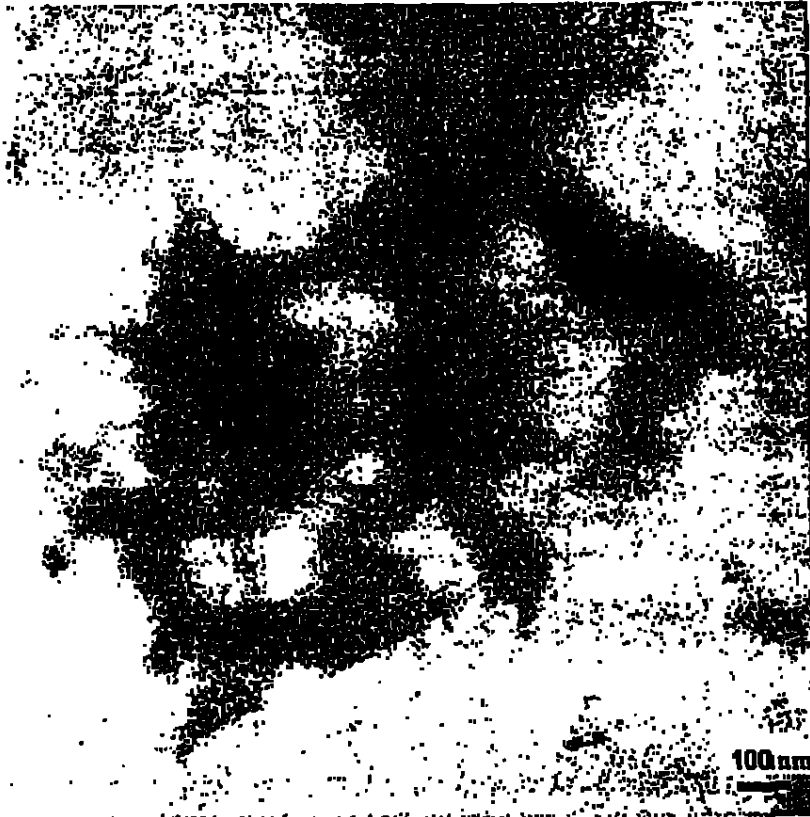
104

101

Fig. 5



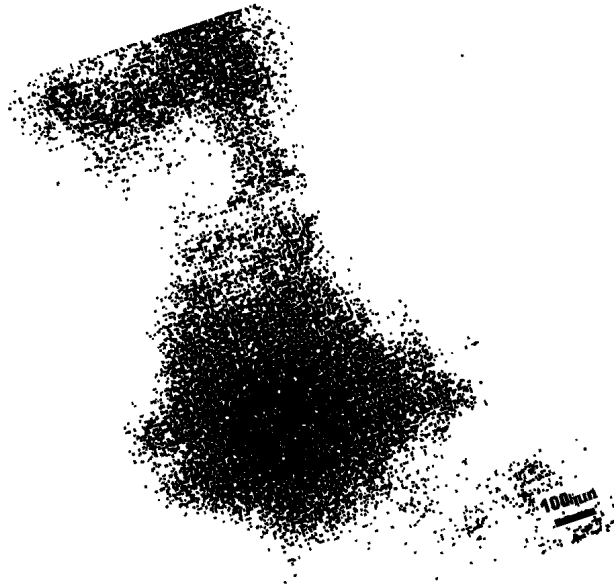
100 nm

Fig. 6

706
103

7/1B

Fig. 7



205

Fig. 8

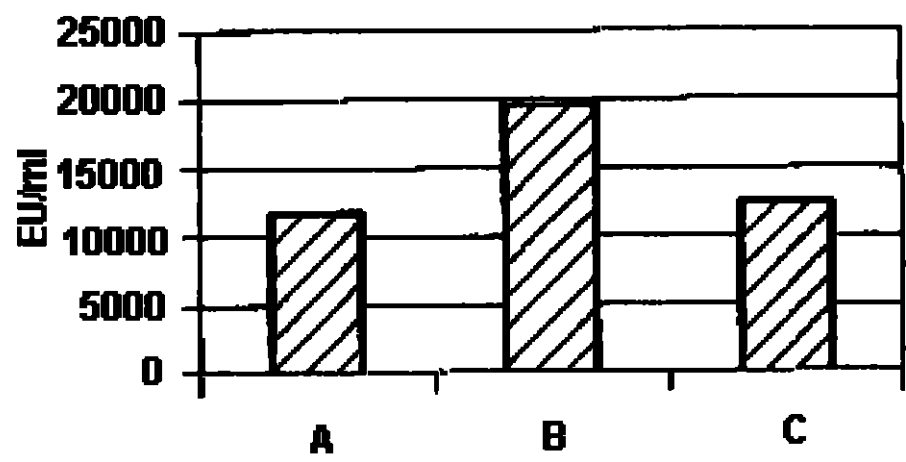


Fig. 9

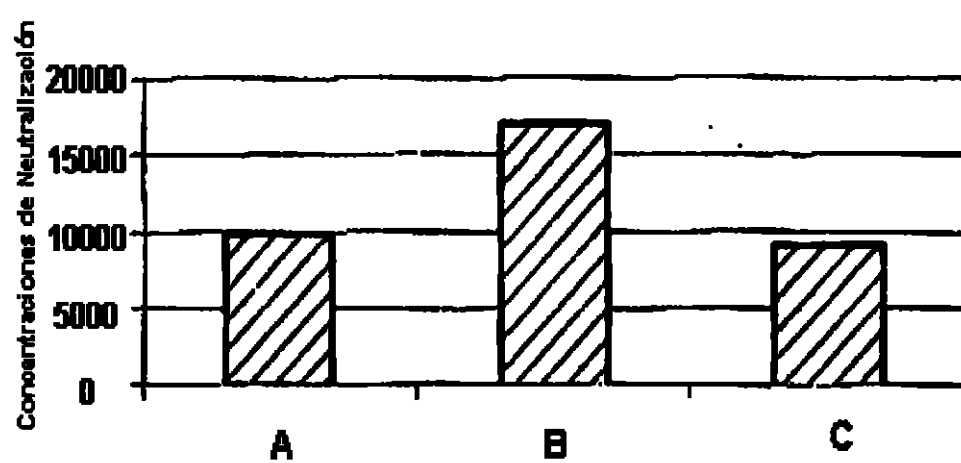


Fig. 10

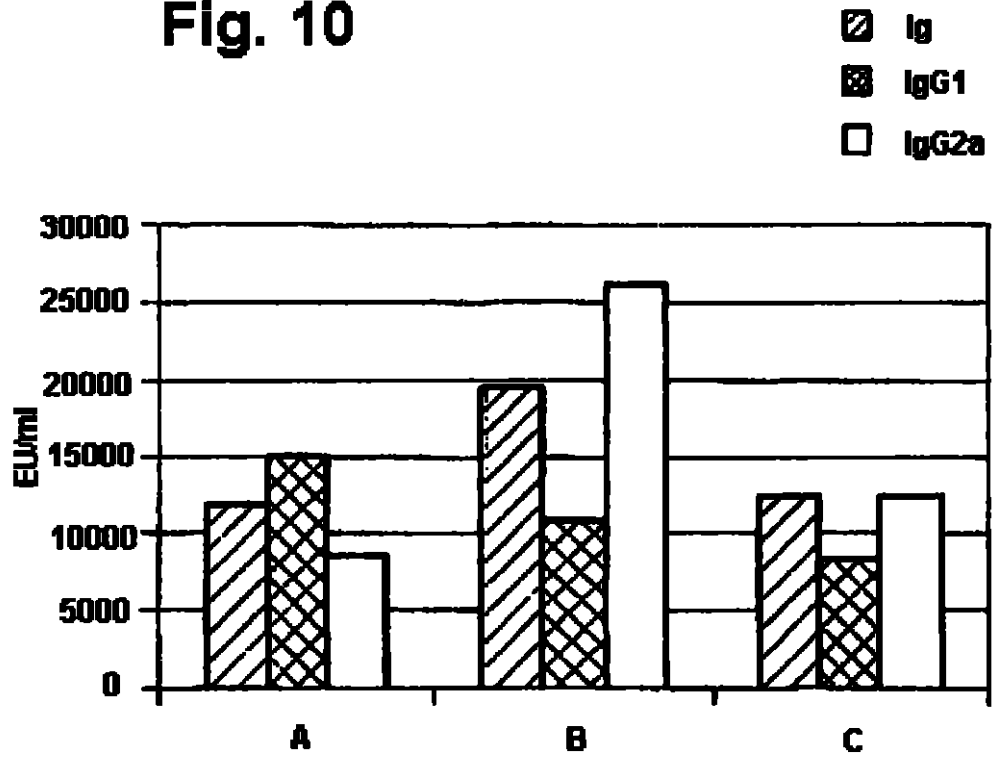


Fig. 11

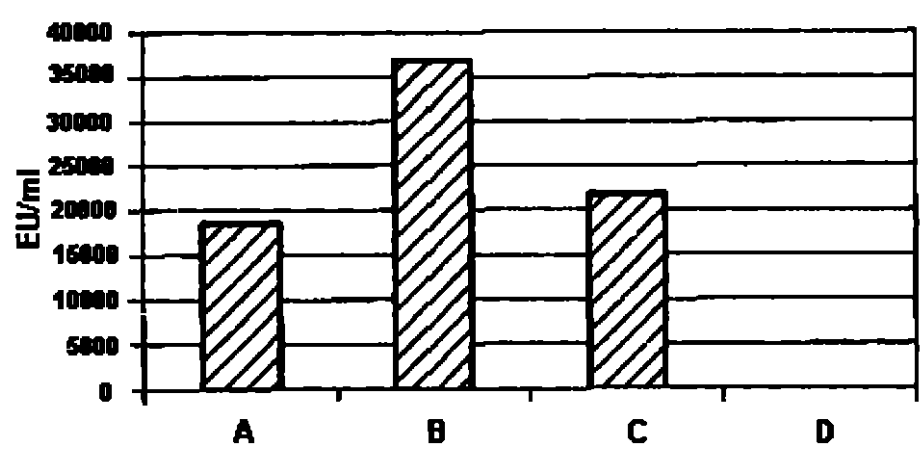


Fig. 12

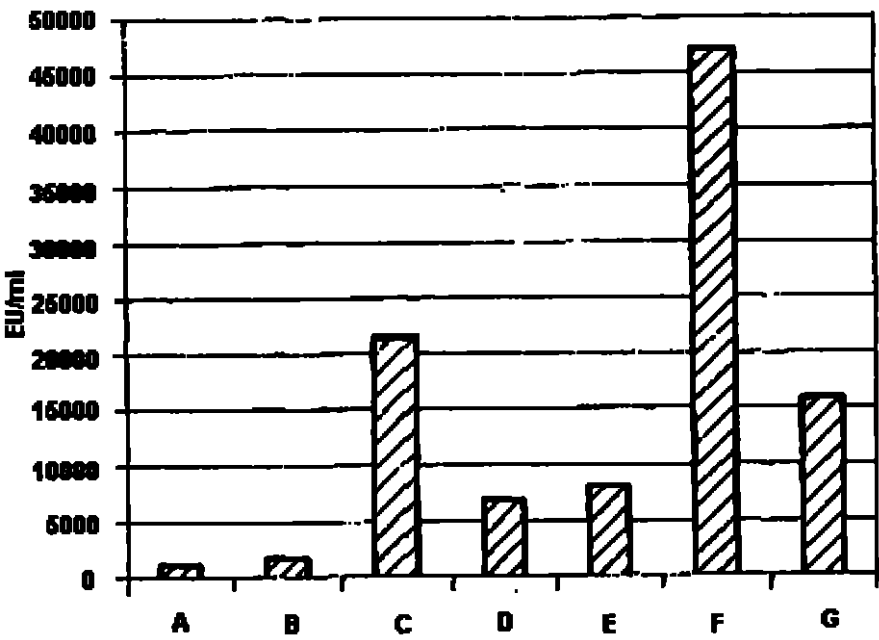


Fig. 13

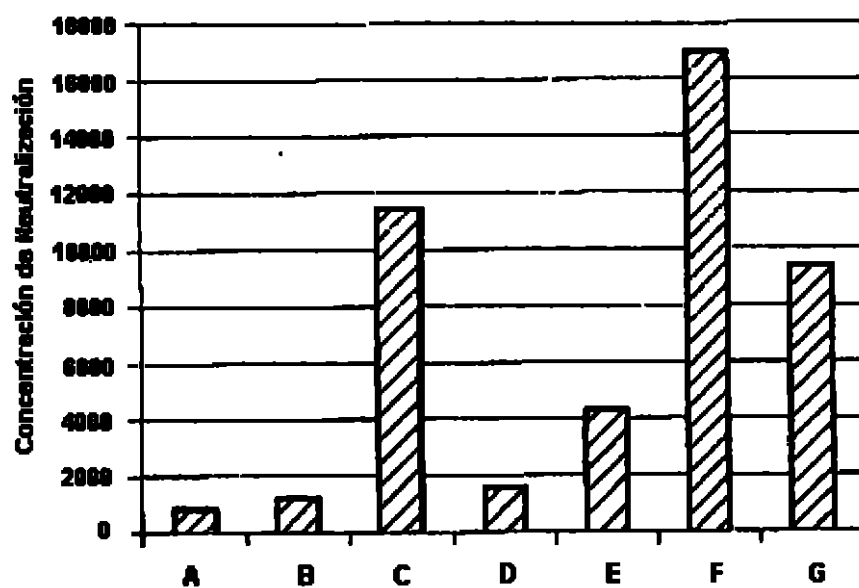


Fig. 14

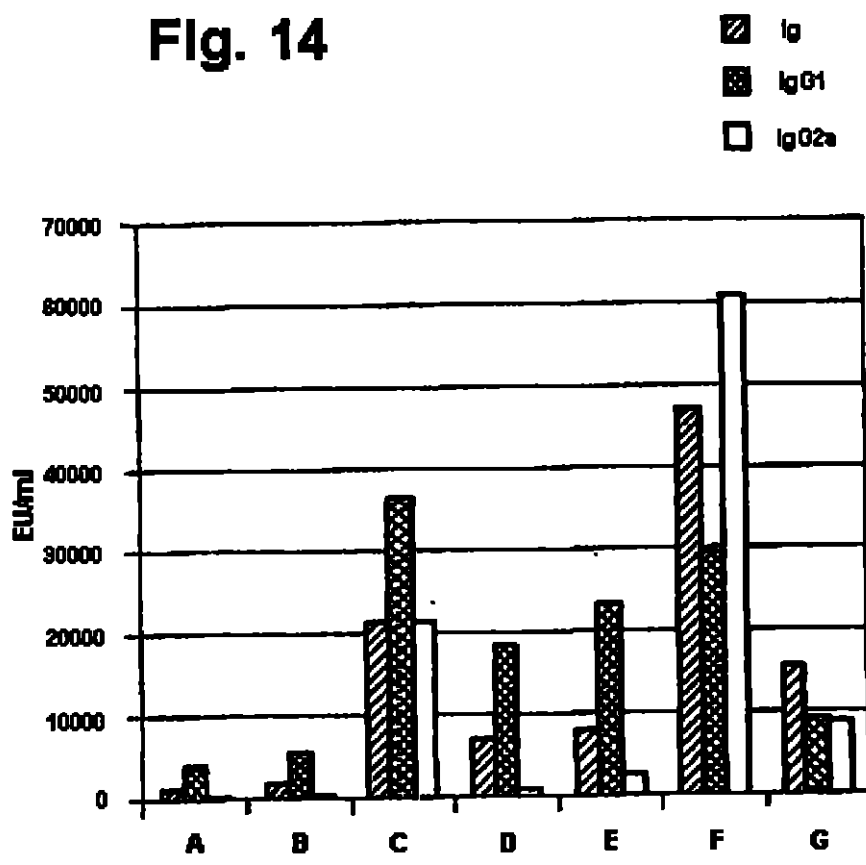


Fig. 15

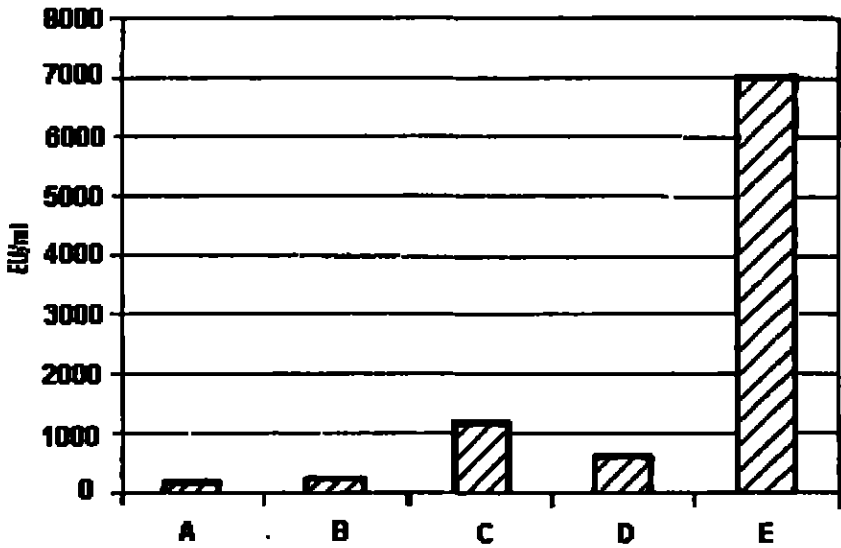


Fig. 16

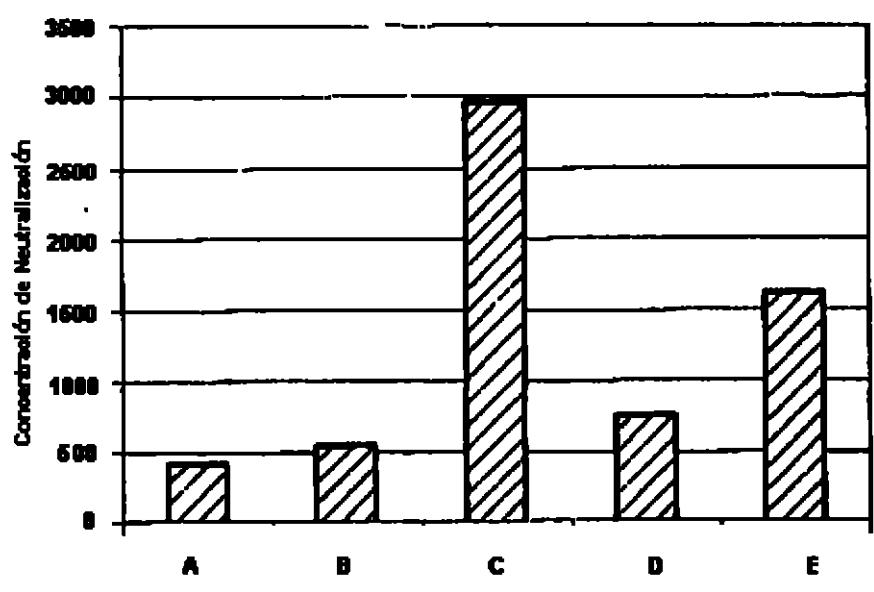


Fig. 17

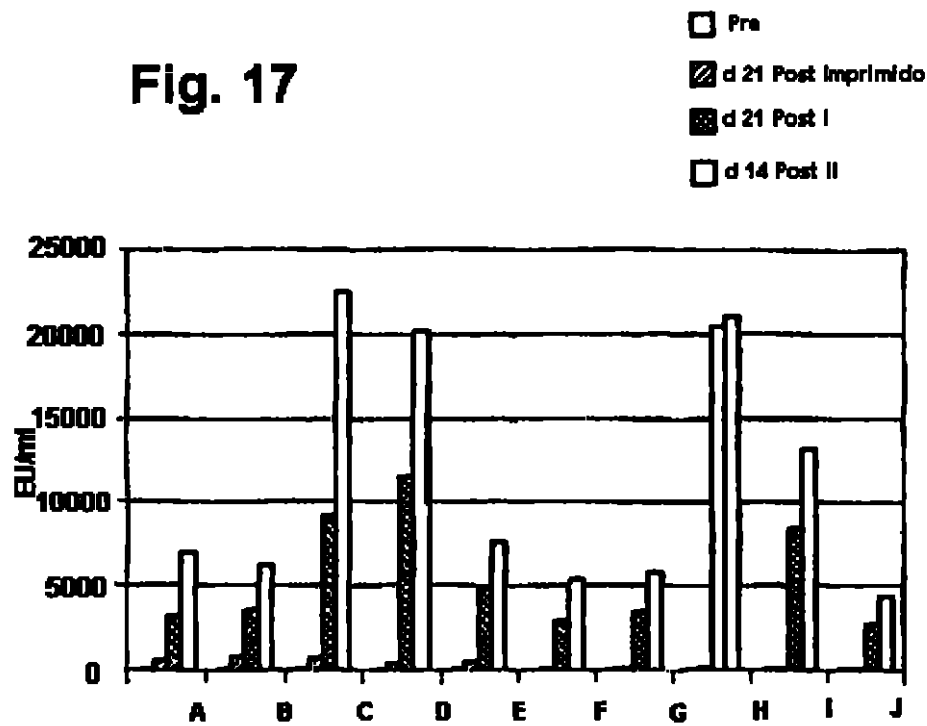
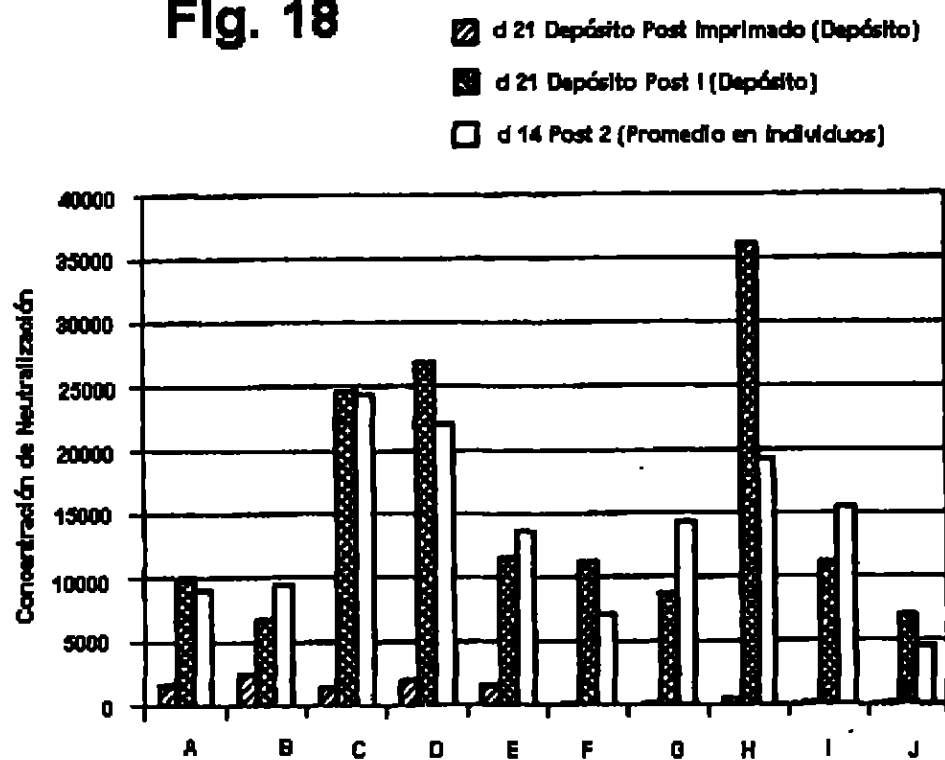


Fig. 18



REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE

PCT.

PATENTE DE INVENCION ☒

MODELO DE UTILIDAD ☐

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente ☒ 1
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud ☒ 1
- Descripción de la invención ☒ 49
- Dibujos de ser estos pertinentes ☒ 100
- Comprobante de Pago de las tasas establecidas ☒ 2,3

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 ☐

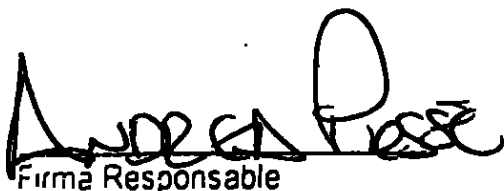
INCOMPLETA ☐

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 de trazado ☐
- Comprobante de pago de las tasas establecidas. ☐

COMPLETA ☐

INCOMPLETA ☐


Firma Responsable

Fecna _____



2020
Bogotá, D.C.,

Doctor:
José Antonio Lloreda
Apoderado
Glaxosmithkline Biologicals

Oficio N°

09511

ASUNTO:	Radicación N°	03-027702
	Solicitud internacional	PCT/EP2001/11328
	Fecha inicio fase nacional	02/05/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

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:

- ☐ La solicitud tiene un solicitante diferente al que figura en la solicitud internacional
- ☐ 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. (Art. 26-k) Decisión 486).
- ☒ 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.

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 N° 10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la División de Nuevas Creaciones.

31 OCT. 2003

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha _____.