



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

PCT

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

03-27703

21. EXPEDIENTE N°

54. TÍTULO "PREPARACION DEL VIRUS CON ENVOLVENTE, DIVIDIDO, PARA SUMINISTROS INTRANASAL"

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/12 , 39/155 , 39/245

71. SOLICITANTE GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICAL S.A.

DOMICILIO RIXENSART, BELGICA

74. REPRESENTANTE LEGAL JOSE ANTONIO LLOREDA

I.P. 10.784
Código 231

22. BOGOTÁ, D.C. 2 ABR. 2003

Q7

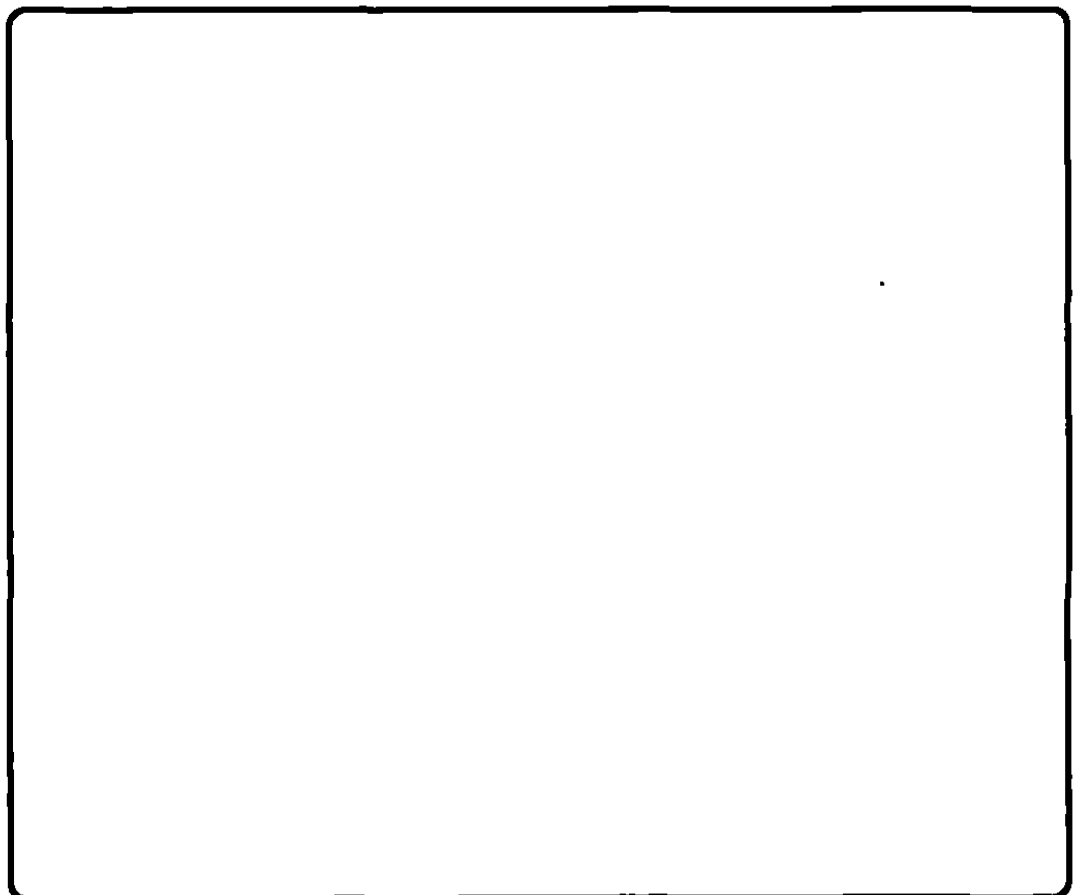
⑩

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 las comunidades indígenas.
- ☐ Arte Final 12X12.
- ☐ De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por 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 y su traducción, Publicación con su traducción, dibujos y Capít. Reivindicatorio como fue originalmente presentado en fase internacional.

⑪

FIGURA CARACTERISTICA:



⑫

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: JOSE ANTONIO LLOREDA

FIRMA:

C.C. 17.159.881 Bta. T.P. 10.784



Industria y Comercio

SUPERINDUSTRIA Y COMERCIO

Radicacion : 03027703 00000000

Folios: 105 D E N C I A

Fecha (AMD): 2003-04-02 16:07:44

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE NNCI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 02 - 86,477
FECHA : DICIEMBRE 24 DE 2002

***** CONSIGNACION *****

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

***** C O N C E P T O *****

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

SOM: TRESCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS

RESPONSABLE : 

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE N°. _____

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



3

Industria y Comercio**SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO**

Radicacion : 03027703 00000000

Folios: 105

Fecha (AMD): 2003-04-02 16:07:44

Tramite : 011 PCT-PATENT 379 FASE MACI 411 PRESENTAC

Dependencia: 2020 DIVISION DE NUEVAS CREACIONES

MIT : 800176089-2

CERTIFICACION DE EXCEDENTE : 03 - 15,518
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	056-00110-6	8284110	04/03/2003	345,000.00

******* CONCEPTO *******

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

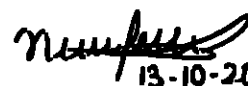
SON: VEINTIDOS MIL PESOS

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.Calle 13 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

- Se retiran folios:
4. Extracto de publicación.
 5. Ficha de autor.
 6. Ficha Terrestre.


13-10-2008.
202052.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 01/11326

A. CLASIFICACION DE MATERIA

IPC 7 A61K39/12 A61K39/155 A61K39/245 A61K9/00

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

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

IPC 7 A61K

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

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

MEDLINE, CHEM ABS Dato, BIOSIS, EPO-Internacional,, PAJ, WPI Dato

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
X	BETTS R F: "Vacunas en la prevención de neumonia viral." SEMINARS IN RESPIRATORY INFECTIONS, (1995 DIC) 10 (4) 282-7. REF: 34, XP001026636	11, 18
Y	página 282 página 286, columna de la izquierda ---	12
X	KUNO-SAKAI H ET AL: "Desarrollos en vacunas de virus de influenza mucosal" VACCINE, (1994 NOV) 12 (14) 1303-10., XP001026644 página 1303 - página 1304; figura 1 ---	15, 18
X	WO 91 13281 A (PFEIFFER ERICH GMBH & CO KG) 5 de Septiembre de 1991 (1991-09-05) citado en la aplicación todo el documento --- -/--	15, 16, 18

☒ 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

'B' 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

29 de Enero de 2002

Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional

08/02/ 2002

Nombre y dirección de correo de ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. No. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax No. (+31-70) 340-3016

Funcionario autorizado

Mennessier, T

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 01/11326

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría *	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	ENDERS-RUCKLE G: "Frecuencia, serodiagnóstico y rasgos epidemiológicos de panencefalitis esclerosante subaguda (SSPE) y epidemiología y vacunación—política para el sarampión en la República Federal de Alemania (FRG)" DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDARDIZATION, (1978) 41 195-207, XP001027713 página 199 – página 200 página 203; tabla VI	11, 12, 18
Y	STAHL-HENNIG C ET AL; "Inmunización con SIV tratado con tween-éter adsorbido sobre hidróxido de aluminio que protege a los cerdos contra la infección SIV experimental" VIROLOGY, (1992 FEB) 186 (2) 588-96., XP001026357 página 588 – página 589	11, 18
Y	DALSGAARD K ET AL: "Vacunación de cerdos contra la cólera porcina (clásica fiebre de cerdo) con una vacunación partida detergente". ACTA VETERINARIA SCANDINAVICA, (1976) 17 (4) 465-74., XP001027714 página 465 página 467	11, 12, 18
Y	VAANANEN P ET AL: "Purificación a gran escala del virus de la rubéola y separación de una vacuna partida experimental del virus de rubéola". APPLIED MICROBIOLOGY, (1971 SEP) 22 (3) 255-9 XP001027710 todo el documento	11, 12, 18
Y	LINA B ET AL: "Una Triton X-100-Vacuna partida de virión de influenza es segura y cumple las recomendaciones de los productos medicinales registrados (CPMP) para la Comunidad Europea para inmunogenicidad, en niño, adultos y los ancianos". BIOLOGICALS, (2000 JUN) 28 (2) 95-103., XP001026651 página 96, columna de la izquierda	11, 12, 18
P,X	W0 01 21151 A (SLAOUI MONCEF MOHAMED; SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG (BE); FRIEDE MART) 29 de Marzo de 2001 (2001-03-29) página 15; ejemplo 5	15, 16, 18
P,Y	página 35 – página 39 reivindicación 9	11, 12, 18

9
6

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/EP 01/11326

INFORMACION ADICIONAL QUE CONTINUA DE PCT/ISA/210

Continuación de la Casilla I.2

Reivindicaciones Nos. : 1-18 (cada una parcialmente)

La expresión "preparación de un virus dividido cubierto" parece que no tiene un significado definido. De la descripción (ver página 5, líneas 20-30) podría inferirse que dicha expresión podría comprender un virus cubierto del cual el lípido que contiene un sobre/cubierto viral ha sido liberado y solubilizado con la acción de un disolvente o detergente orgánico para romper dicho sobre/cubierto así como una preparación de subunidades de virus la cual podría comprender únicamente una o unas pocas proteínas virales altamente purificadas. Teniendo en cuenta la redacción de la reivindicación 4, adicionalmente podría parecer que dicha preparación altamente purificada puede estar libre de agentes divisorios residuales y, por lo tanto, no podría distinguirse de una preparación de proteínas purificadas obtenidas usando un proceso que no comprende el uso de un agente divisorio como es el caso cuando las proteínas purificadas se producen de manera recombinante, y, la producción de lo cual no hubiera exigido la característica técnica funcional esencial a que las reivindicaciones hacen referencia como es el uso de un agente divisorio. En vista de la incertidumbre asociada con dicha expresión, la búsqueda se ha limitado (todas las reivindicaciones que interesan) a "vacunas divididas" que no son vacunas de subunidades dentro del significado dado a las líneas 26-27 en la página 5 de la descripción.

Se llama la atención del solicitante respecto al hecho de que las reivindicaciones o partes de las reivindicaciones, relacionadas con invenciones respecto de las cuales no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional no tienen que ser el objeto de un examen preliminar internacional (Norma 66.1(e) del PCT). Se le informa al solicitante que la política de la EPO al actuar como Autoridad de Examen Preliminar Internacional normalmente es no llevar a cabo un examen preliminar en asuntos que no se han buscado. Este es el caso prescindiendo de si las reivindicaciones se enmiendan siguiendo el recibo del reporte de búsqueda o durante cualquier procedimiento del Capítulo II.

**Solicitud Internacional No.
PCT/EP 01/11326**

Forma PCT ISA 210 (anexo familia de patentes) (Julio 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP 01/11326

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 A61K39/12 A61K39/155 A61K39/245 A61K9/00

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 A61K

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)

MEDLINE, CHEM ABS Data, BIOSIS, EPO-Internal, PAJ, WPI Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	BETTS R F: "Vaccines in the prevention of viral pneumonia." SEMINARS IN RESPIRATORY INFECTIONS, (1995 DEC) 10 (4) 282-7. REF: 34 , XP001026636	11,18
Y	page 282 page 286, left-hand column	12
X	KUNO-SAKAI H ET AL: "Developments in mucosal influenza virus vaccines." VACCINE, (1994 NOV) 12 (14) 1303-10. , XP001026644 page 1303 -page 1304; figure 1	15,18
X	WO 91 13281 A (PFEIFFER ERICH GMBH & CO KG) 5 September 1991 (1991-09-05) cited in the application the whole document	15,16,18
	--- -/-	



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 referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 January 2002

Date of mailing of the international search report

08/02/2002

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 6618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 661 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mennessier, T

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/11326

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	ENDERS-RUCKLE G: "Frequency, serodiagnosis and epidemiological features of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) and epidemiology and vaccination—policy for measles in the Federal Republic of Germany (FRG)." DEVELOPMENTS IN BIOLOGICAL STANDARDIZATION, (1978) 41 195-207. , XP001027713 page 199 -page 200 page 203; table VI	11,12,18
Y	STAHL-HENNIG C ET AL: "Immunization with tween-ether-treated SIV adsorbed onto aluminum hydroxid protects monkeys against experimental SIV infection." VIROLOGY, (1992 FEB) 186 (2) 588-96. , XP001026357 page 588 -page 589	11,18
Y	DALSGAARD K ET AL: "Vaccination of pigs against hog cholera (classical swine fever) with a detergent split vaccine." ACTA VETERINARIA SCANDINAVICA, (1976) 17 (4) 465-74. , XP001027714 page 465 page 467	11,12,18
Y	VAANANEN P ET AL: "Large-scale purification of rubella virus and preparation of an experimental split rubella virus vaccine." APPLIED MICROBIOLOGY, (1971 SEP) 22 (3) 255-9. , XP001027710 the whole document	11,12,18
Y	LINA B ET AL: "A <u>TritonX-100</u> - split virion influenza vaccine is safe and fulfills the committee for proprietary medicinal products (CPMP) recommendations for the European Community for Immunogenicity, in Children, Adults and the Elderly." BIOLOGICALS, (2000 JUN) 28 (2) 95-103. , XP001026651 page 96, left-hand column	11,12,18
P,X	WO 01 21151 A (SLAOUI MONCEF MOHAMED ;SMITHKLINE BEECHAM BIOLOG (BE); FRIEDE MART) 29 March 2001 (2001-03-29) page 15; example 5	15,16,18
P,Y	page 35 -page 39 claim 9	11,12,18

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

Continuation of Box I.2

Claims Nos.: 1-18 (each partly)

The expression "a split enveloped virus preparation" appears not to have a definite meaning. From the description (see page 5, lines 20-30) it could be inferred that said expression could encompass enveloped virus of which the lipid containing viral envelope has been released and solubilized upon action of an organic solvent or detergent to disrupt said envelope as well as a subunit virus preparation which could consist of only one or a few highly purified viral proteins. Taken into account the wording of claim 4, it would additionally appear that such a highly purified preparation may be free of any residual splitting agents, and, therefore, could not be distinguished from a preparation of purified proteins obtained using a process which does not involve the use of a splitting agent as is the case when purified proteins are recombinantly produced, and, the production of which had not required the essential functional technical feature referred to in the claims as the use of a splitting agent. In view of the uncertainty associated with the said expression, the search has been limited (all claims concerned) to "split vaccines" which are not subunit vaccines within the meaning given at lines 26-27 on page 5 of the description.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims, or parts of claims, relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66.1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 01/11326

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9113281	A	05-09-1991	DE 4005528 A1 29-08-1991
			AT 111577 T 15-09-1994
			AU 7064591 A 18-09-1991
			DE 59007175 D1 20-10-1994
			WO 9113281 A1 05-09-1991
			EP 0516636 A1 09-12-1992
			ES 2060361 T3 16-11-1994
			US 5368201 A 29-11-1994
WO 0121151	A	29-03-2001	AU 7522600 A 24-04-2001
			AU 7782500 A 24-04-2001
			WO 0121151 A1 29-03-2001
			WO 0121152 A1 29-03-2001
			AU 7907000 A 24-04-2001
			WO 0121207 A2 29-03-2001

15
12

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA CONFORME AL
TRATADO DE COOPERACIÓN SOBRE PATENTES (T C P)

(19) Organización Mundial de la Propiedad Intelectual
OMPI
Oficina Internacional

[código de barras]

(43) Fecha de publicación internacional: T C P
11 de abril de 2002 (11.04.2002)

(10) Número de publicación internacional:
WO 02/028422 A3

(51) Clasificación Internacional de patente: A61K 39/12, 39/155, 39/245, 9/00 (21) No. de solicitud internacional: PCT/EP01/11326 (22) Fecha de presentación internacional: 1 de octubre de 2001 (01.10.2001) (25) Idioma de presentación: Inglés (26) Idioma de publicación: Inglés (30) Datos de prioridad: 0024089.5, 2 de octubre 2000 (02.10.2000) GB (71) Solicitante (para todos los Estados designados, menos US): SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S. A. (BE/BE); Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE) (72) Inventores y (75) Solicitantes: (sólo para US) COLAU, Brigitte, Desiree, Alberte (BE/BE); SmithKline Beecham Biologicals; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE); DESCHAMPS, Marguerite (BE/ BE); SmithKline Beecham Biologicals, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE) (74) Agentes: STEPHEN, Robert J.; Corporate Intellectual Property (CN9.25.1), GlaxoSmithKline 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).	(81) Estados designados (nacional): 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) Estados designados (regional): patente ARIPO (GH, GM KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW); patente eurásica (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). Publicada: —Con informe de búsqueda internacional (88) Fecha de publicación del informe de búsqueda internacional: 29 de agosto de 2002. Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, hágase referencia a las "Notas de guía sobre códigos y abreviaturas" que aparece al comienzo de cada número regular de la Gaceta del TCP
CÓDIGO DE BARRAS VERTICAL WO 02/028422 A3	
(54) Título: PREPARACIÓN DE VIRUS CON ENVOLVENTE, DIVIDIDO, PARA SUMINISTRO INTRANASAL (57) Resumen: En particular, la presente invención se refiere a formulaciones de vacuna que comprenden preparaciones de virus con envoltente, divididos, que no son preparaciones de virus de <i>influenza</i> dividido, en la fabricación de una formulación de vacuna para suministro intranasal; a métodos de fabricación de dicha formulación; y al uso de esas vacunas en la profilaxis o la terapia de enfermedades.	

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



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

PCT

(10) International Publication Number
WO 02/028422 A3

- (51) International Patent Classification⁷: A61K 39/12, 39/155, 39/245, 9/00
- (21) International Application Number: PCT/EP01/11326
- (22) International Filing Date: 1 October 2001 (01.10.2001)
- (25) Filing Language: English
- (26) Publication Language: English
- (30) Priority Data:
0024089.5 2 October 2000 (02.10.2000) GB
- (71) Applicant (for all designated States except US):
SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.
[BE/BE]; Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (72) Inventors; and
(75) Inventors/Applicants (for US only): COLAU, Brigitte,
Desiree, Alberte [BE/BE]; SmithKline Beecham Biolog-
icals, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). DE-
SCHAMPS, Marguerite [BE/BE]; SmithKline Beecham/
Biologicals, Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (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).
- Published:
— with international search report
- (88) Date of publication of the international search report:
29 August 2002
- (74) Agent: STEPHEN, Robert, J.; Corporate Intellectual
Property (CN9.25.1), GlaxoSmithKline, 980 Great West
Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS (GB).
- For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guid-
ance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the begin-
ning of each regular issue of the PCT Gazette.

(54) Title: SPLIT ENVELOPED VIRUS PREPARATION FOR INTRANASAL DELIVERY

(57) Abstract: In particular the present invention relates to vaccine formulations comprising split enveloped virus preparations, not split *influenza* virus preparations, in the manufacture of a vaccine formulation for intranasal delivery, methods of manufacture of such formulations and use of such vaccines in the prophylaxis or therapy of disease.

WO 02/028422 A3

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

Reivindicaciones:

1. El uso de una preparación de envoltura rota de virus la cual no es un *virus de influenza* roto en la fabricación de una formulación de vacuna para administración intranasal.
2. El uso de conformidad con la reivindicación 1 en la cual la preparación del virus de envoltura rota es un virus simple o una mezcla de un virus syncytial respiratorio de influenza, un virus de parainfluenza, virus simples de sarampión y herpes.
3. El uso de conformidad con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 en la cual la preparación del virus de envoltura rota comprende fragmentos de membrana viral, proteínas de envoltura de membrana viral, matriz viral y nucleoproteínas.
4. El uso de conformidad con una de las reivindicaciones 1-3 las cuales comprenden adicionalmente uno o más agentes de rotura residuales.
5. El uso de conformidad con la reivindicación 4 en la cual el agente de rotura residual se selecciona del grupo que consta de laurenth 9, NaDOC, grupo Sarcosil, Tween 80™ y Triton X100™.
6. El uso de conformidad con la reivindicación 5 en la cual el agente de rotura es NaDOC o Sarkosil.

7. El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 las cuales comprenden adicionalmente un agente estabilizador.

8. El uso de conformidad con la reivindicación 7 en la cual el agente estabilizador es un surfactante.

9. El uso de conformidad con la reivindicación 8 en la cual el surfactante es simple o una mezcla de monoleato de sorbitán polioxietileno (TWEEN80™), t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X100™) y éter polioxietileno-9-lauril.

10. El uso según se reivindica en cualquiera de las reivindicaciones anteriores las cuales adicionalmente comprenden un adyuvante.

11. Un método para producir una formulación según se reivindica en una de las reivindicaciones anteriores la cual comprende los pasos de

(a) rotura de un virus de envoltura; y

(b) mezcla opcional de la preparación del virus de envoltura rota con un agente estabilizante; y

(c) mezcla opcional de la preparación del virus de envoltura rota con un adyuvante.

(transportador y/o inmunoestimulante).

12. Un método para producir una formulación de vacuna según se reivindica en la Reivindicación 11 en la cual el agente estabilizante es al menos un surfactante seleccionado del grupo que comprende monoleato

20
17

sorbitán polioxietileno (TWEEN80™), t-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X100™) y éter polioxietileno-9-lauril.

13. El uso de una preparación de vacuna del virus de envoltura rota, la cual no es una preparación del virus de *influenza* rota en la fabricación de una formulación de vacuna intranasal para la profilaxis o tratamiento de la enfermedad.

14. Un equipo para aplicar una preparación de vacuna intranasal según se reivindica en una de las reivindicaciones 1-10 que comprende:

(a) una preparación de un virus de envoltura rota; y

(b) un dispositivo para aplicación intranasal.

15. Un dispositivo para aplicación intranasal que comprende una vacuna de conformidad con una de las reivindicaciones 1-10.

16. Un dispositivo de conformidad con la reivindicación 15 el cual es un dispositivo de entrada a presión.

17. Un método para proteger o tratar a un mamífero susceptible de, o que sufre una enfermedad ocasionada por un virus de envoltura, el método comprende la administración de una vacuna de conformidad con las reivindicaciones 1-10 vía nasal.

18. Un método, uso, equipo o dispositivo de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones anteriores en el cual la formulación de vacuna es inmunogénica en individuos seropositivos y seronegativos.

27
18**Claims:**

1. The use of a split enveloped virus preparation which is not a split *influenza* virus preparation in the manufacture of a vaccine formulation for intranasal delivery.
2. The use according to claim 1 wherein the split enveloped virus preparation is either singly or a mixture of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, measles and herpes simplex virus.
3. The use according to claim 1 or claim 2 wherein the split enveloped virus preparation comprises viral membrane fragments, viral membrane envelope proteins, viral matrix and nucleoproteins.
4. The use according to any one of claims 1 - 3 which additionally comprises one or more residual splitting agents.
5. The use according to claim 4 wherein the residual splitting agent is selected from the group consisting of: laureth 9, NaDOC, Sarcosyl group, Tween 80™, and Triton X100™.
6. Use according to claim 5 wherein the splitting agent is NaDOC or Sarcosyl.
7. The use according to any one of claims 1 to 6 which additionally comprises a stabilising agent.
8. The use according to claim 7 wherein the stabilising agent is a surfactant.
9. The use according to 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. The use as claimed in any one of the preceding claims which additionally comprises an adjuvant.

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

(a) splitting an enveloped virus; and

(b) optionally admixing the split enveloped virus preparation with a stabilising agent; and

(c) optionally admixing the split enveloped virus preparation with an adjuvant (carrier and/or immunostimulant).

12. A method of producing a vaccine formulation as claimed in Claim 11 wherein the stabilising agent is at least one surfactant selected from the group comprising polyoxyethylene sorbitan monooleate (TWEEN80™); t-octylphenoxypolyethoxyethanol (TRITON X100™); polyoxyethylene-9-lauryl ether.

13. Use of a split enveloped virus vaccine preparation, which is not a split *Influenza* virus preparation in the manufacture of an intranasal vaccine formulation for the prophylaxis or treatment of disease.

14. A kit for delivery of an intranasal vaccine formulation as claimed in any one of claims 1 - 10 comprising:

(a) a split enveloped virus preparation; and

(b) an intranasal delivery device.

15. An intranasal delivery device comprising a vaccine according to any of claims 1-10.

16. A device according to claim 15 which is a pressure threshold device.

17. A method for protecting or treating a mammal susceptible to, or suffering from disease caused by an enveloped virus, the method comprising administering a vaccine according to claims 1-10 via a nasal route.

23
10

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

24
21

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Referencia Solicitantes o agentes RJS/B45211	SI SE REQUIERE ACCION POSTERIOR	Ver Notificación de Transmisión de Informe de Examen Preliminar Internacional (Formato PCT/IPEA/416)																								
Solicitud Internacional No. PCT/EP01/11326	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 A61K 39/12																										
Solicitante SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A.																										
1. Este informe 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>9</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 3 de páginas.																										
3. Este informe contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems: <table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 5%;">I</td> <td style="width: 5%;">☒</td> <td>Bases del reporte</td> </tr> <tr> <td>II</td> <td>☐</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td>III</td> <td>☒</td> <td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad Industrial</td> </tr> <tr> <td>IV</td> <td>☐</td> <td>Falta de unidad de invención</td> </tr> <tr> <td>V</td> <td>☒</td> <td>Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td> </tr> <tr> <td>VI</td> <td>☐</td> <td>Ciertos documentos citados</td> </tr> <tr> <td>VII</td> <td>☐</td> <td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td> </tr> <tr> <td>VIII</td> <td>☐</td> <td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td> </tr> </table>			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) 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
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) 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 09.09.2002																									
Nombre y dirección de correo de la autoridad internacional de examen preliminar European Patent Office D-80298 Munich Tel. No. +49 89 2399-0 Tx. 523656 epmu d Fax No. +49 89 2399 - 4465	Funcionario autorizado Mennessier, T Teléfono No. +49 89 2399 8687																									

I. Bases del Reporte

1. Respecto a los elementos de la solicitud internacional: (Carátulas 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:

1-29 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, No.:

1-18 con telefax de 31/07/2002

Dibujos, No.:

1-16 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.

23

☐ 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. La cuestión de si la invención reivindicada parece ser novedosa, involucrar nivel inventivo (no ser obvio), o ser industrialmente aplicable no se ha examinado en relación con:

☐ toda la solicitud internacional.

☒ las reivindicaciones Nos. 1-18

porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 17 y 18 (con respecto a la aplicabilidad industrial) se relaciona con el siguiente asunto/materia que no requiere examen preliminar Internacional (*especificar*):

ver hoja anexa

☐ 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. 1-18 (cada parte) 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.

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

1. Afirmación

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL

Novedad (N)	Sí:	Reivindicaciones 1-14, 17 y 18 (parte) * ver punto 2a de la hoja separada*
	No:	Reivindicaciones 15, 16 y 18 (parte)
Nivel inventivo (IS)	Sí:	Reivindicaciones 1-10, 13, 14, 17 y 18 (parte) * ver punto 2a de la hoja separada*
	No:	Reivindicaciones 11, 12, 15, 16 y 18 (parte)
Aplicabilidad industrial (IA)	Sí:	Reivindicaciones 1-16 * ver punto 2a de la hoja separada*
	No:	Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones

Ver hoja separada

28
5

1. Comentarios respecto al ítem III

- a) Las reivindicaciones 17 (toda) y 18 (parcialmente) se relacionan con un objeto que esta Autoridad considera que está comprendido en las disposiciones de la Norma 67.1 (iv) del PCT.
- (i) Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial del objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(i) PCT).
- (ii) Para la evaluación de dichas reivindicaciones sobre la cuestión de si son industrialmente aplicables no existe un criterio unificado en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de las reivindicaciones. La EPO, por ejemplo, no reconoce el objeto de las reivindicaciones como aplicable industrialmente en cuanto al uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, reivindicaciones en cuanto a 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 novedoso.
- b) En la descripción se han suministrado datos técnicos valiosos en cuanto a la inmunogenicidad de las preparaciones de virus con envoltente divididos, es decir, su capacidad de inducir una respuesta inmune potente al ser administrados intranasalmente (ver los Ejemplos 2 y 3 en las páginas 24-29) únicamente para los virus de la familia Paramyxoviridae. Por lo tanto, parece que existe un soporte suficiente en la descripción únicamente para esa parte del objeto reivindicado que se relaciona con preparaciones de vacunas que contienen dichos virus.

2. Comentarios respecto al ítem V

a) Observación preliminar

En vista de los comentarios hechos en el punto 1 anterior, se hacen los siguientes comentarios en cuanto a la novedad y nivel inventivo respecto a las reivindicaciones 1-18, en cuanto a que el virus a que el presente hace referencia pertenece a la familia Paramyxoviridae.

De manera semejante, se hacen comentarios en cuanto a la aplicabilidad industrial para las mismas partes del objeto reivindicado según se define únicamente en las reivindicaciones 1-16.

b) Documento citado

Se hace referencia a los siguientes documentos los cuales se citaron en el reporte de búsqueda internacional.

- # D1: *Seminarios en Infecciones Respiratorias*, 10(4), 1995, 282-7, XP001026636
- # D2: *Vacunas*, 12(14), Noviembre 1994, 1303-10, XP001026644
- # D3: *Desarrollos en Estandarización Biológica*, 41, 1978, 195-207 XP001027713
- # D4: *Acta Veterinaria Scandinavia*, 17(4), 1976, 465-74 XP001027714
- # D5: *Microbiología Aplicada*, 22(3), 1971, 255-9 XP001027710
- # D6: *Biologicals*, 28(2), Junio 2000, 95-103 XP001026651
- # D7: WO 91/13281
- # D8: WO 01/21151

c) Novedad (Artículo 33(2) PCT)

- (i) Parece que en el estado de la técnica no se ha revelado el uso de un virus dividido de la familia Paramyxoviridae en la fabricación de una formulación de vacuna para aplicabilidad intranasal o un método para proteger o tratar un mamífero que comprende la administración de dicha vacuna. Por lo tanto, el objeto de las reivindicaciones 1-10, 13, 17 y 18 puede considerarse novedoso, en cuanto a que dicha reivindicación mencionada en última instancia se relaciona con dicho uso o método.
- (ii) Se acepta que en el documento D1 sólo se hace referencia a subunidades de vacunas producidas por solubilización de detergentes de PIV-3 (ver el Capítulo llamado "Vacunas Inactivadas" en la página 286).

Por lo tanto, un método para producir un virus dividido de la familia Paramyxoviridae según se define en la reivindicación 11, siendo la división del virus la única característica esencial de dicho método, debe considerarse como que no ha sido revelado en dicho documento. Como resultado también el objeto de la reivindicación 11 puede considerarse como novedoso. La misma conclusión también aplica *de facto* al objeto de las reivindicaciones 12 y 18 dependientes, en cuanto a que dicha reivindicación mencionada en última instancia se dirige a un método según se define en alguna de las reivindicaciones 11 y 12.

- (iii) La reivindicación 15 se dirige indiscutiblemente, no a una 'combinación' de un dispositivo y una vacuna, sino a un dispositivo. Según se explicó en la página 12 de la descripción, en la técnica son conocidos los dispositivos para aplicabilidad intranasal tales como los dispositivos de entrada a presión o dichos otros como una jeringa desechable de plástico con una punta apropiada para ser usados con la presente invención, ver además el documento D7 (como un todo) y D2 (Figura 1 en la página 1304), respectivamente. La introducción de una vacuna en dicho dispositivo según se define en las reivindicaciones 1-10, mientras que las características técnicas de dicha vacuna no pueden considerarse como características técnicas del dispositivo, no pueden hacer que dicho dispositivo sea novedoso. Por lo tanto, el IPEA se guía por su opinión de que hay que considerar que al objeto de las reivindicaciones 15, 16 y 18 le falta novedad, en cuanto a que dicha reivindicación mencionada en última instancia se relaciona con un dispositivo según se define ya sea en la reivindicación 15 o 16.
- (iv) Un equipo según se define en la reivindicación 14, es decir, que comprende un virus dividido de la familia Paramyxoviridae y un dispositivo de aplicabilidad intranasal parece que no se ha revelado en el estado de la técnica. Por lo tanto, puede considerarse que un equipo según se define en las reivindicaciones 14 y 18 es novedoso, en cuanto a que dicha reivindicación mencionada en última instancia está dirigida a un equipo según se define en la reivindicación 14.
- (v) Para resumir, mientras el objeto de las reivindicaciones 1-14, 17 y 18 puede considerarse novedoso (en cuanto a que la reivindicación mencionada en última instancia no se dirige a un dispositivo), según se define en el punto 2a. anterior, en contraste, el objeto de (a) las reivindicaciones 15, 16 y 18 no se considera novedoso (en cuanto a que dicha reivindicación mencionada en última instancia está dirigida a un dispositivo) según se define en el punto 2a. anterior.

d) Nivel inventivo (Artículo 33(3) del PCT)

- (i) En vista de los resultados presentados en el documento D2 el cual se concentra en el virus de influenza dividido y se tienen en cuenta los otros documentos anteriores citados puede considerarse que una persona experta en la técnica no hubiera hecho una extrapolación directa que la hubiera llevado a considerar que una preparación compuesta por un virus dividido que pertenece a ese grupo particular de virus que pertenecen a la familia Paramyxoviridae puede representar una vacuna eficaz si se administra intranasalmente. Por lo tanto, y en vista de los resultados reportados en la descripción respecto a las preparaciones de vacunas que contienen un virus dividido de dicha familia, el objeto de las reivindicaciones 1-11, 13, 17 y 18 puede considerarse que comprende un nivel inventivo en cuanto a que dicha reivindicación mencionada en última instancia se relaciona con un uso según se define en las reivindicaciones 1-10 y 13 o un método según se define en la reivindicación 17), según se define en el punto 2a. anterior. La misma conclusión puede también aplicar al objeto de las reivindicaciones 14 y 18, en cuanto a que dicha reivindicación se dirige a un equipo según se define en la reivindicación 14.
- (ii) No está claro cuál efecto técnico inesperado podría una persona experta en la técnica haber esperado de la adición de surfactantes conocidos tales como TWEEN 80 o TRITON X100 a una formulación de vacuna. Por lo tanto, un método para producir una formulación de vacuna según se define en la reivindicación 12 no puede considerarse que comprende un nivel inventivo sobre una combinación de alguno de los documentos D1 y D3 (en los cuales se hace referencia a preparaciones de vacunas del virus dividido de sarampión (Paramyxoviridae) (ver páginas 199-200 y la Tabla VI de la página 203) con cualquiera de los documentos D4 (el cual describe el uso de TritonX-100 en la preparación de una vacuna del virus de la peste porcina; ver página 467), D5 (que describe el uso de Tween 80 en la preparación de una vacuna del virus de rubéola dividido; ver página 255-6), y D6 (que describe el uso de TritonX-100 en la preparación de una vacuna del virus de influenza dividido). Además, como el hecho de que dicha formulación de vacuna es inmunogénica opcionalmente en individuos seropositivos y seronegativos según hace referencia la reivindicación 18, es decir, que dicha vacuna puede usarse en individuos naturales y selectos, no parece correlacionarse con un

20
29

paso del procedimiento específico para añadirse al método de alguna de las reivindicaciones 11 y 12, tampoco es posible considerar que el objeto de la reivindicación 18 comprende un nivel inventivo, en cuanto a que se dirige a un método según se define en alguna de las reivindicaciones 11 y 12.

(iii) Para resumir, únicamente el objeto de (a) las reivindicaciones 1-10, 13, 14 y 17 y (b) reivindicación 18 puede considerarse que comprende un nivel inventivo, en cuanto a que la reivindicación mencionada en última instancia se relaciona con (i) un uso según se define en las reivindicaciones 1-10 y 13, y (ii) un equipo según se define en la reivindicación 14, o (iii) un método según se define en la reivindicación 17), según se define en el punto 2a. anterior.

e) Aplicabilidad industrial (Artículo 33(4) del PCT)

El objeto de las reivindicaciones 1-16 puede ser considerado como susceptible de aplicabilidad industrial.

f) Documento Intermedio

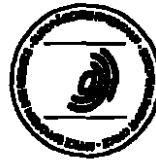
Si la prioridad parece que no se ha reivindicado validamente, el documento D8 debe tenerse en cuenta al evaluar si el objeto de las reivindicaciones 11, 12, 15, 16 y 18 es novedoso o comprende un nivel inventivo.

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

Re 39
31From the
INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINING AUTHORITY

To: Robert J. STEPHEN GlaxoSmithKline Corporate Intellectual Property 980 Great West Road Brentford Middlesex TW8 9GS GRANDE BRETAGNE	GlaxoSmithKline Corporate IP Received BRENTFORD		PCT NOTIFICATION OF TRANSMITTAL OF THE INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT (PCT Rule 71.1)
	11 SEP 2002		
	ATTY: <u>RJS</u>	ADMIN: <u>KA</u>	
	IPM: <u>NYA</u>	ON: <u> </u> UPDATED ON: <u> </u>	
ATTY CHECKED/FILE		Date of mailing (day/month/year)	09.09.2002
Applicant's or agent's file reference RJS/B45239		IMPORTANT NOTIFICATION	
International application No. PCT/EP01/11326	International filing date (day/month/year) 01/10/2001	Priority date (day/month/year) 02/10/2000	
Applicant SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. et al.			
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-80286 Munich Tel. +49 89 23696 - 0 Tlx 523656 apmu d Fax: +49 89 23696 - 4485		Authorized officer Cleere, C Tel. +49 89 23696-7713 	

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference RJS/B45211	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/EP01/11326	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 A61K39/12		
Applicant SMITHKLINE BEECHAM BIOLOGICALS S.A. et al.		
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 9 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 3 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 09.09.2002	
Name and mailing address of the international preliminary examining authority:  European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tlx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Mennessier, T Telephone No. +49 89 2399 8687 	

86
33

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP01/11326

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:

1-29 as originally filed

Claims, No.:

1-18 with telefax of 31/07/2002

Drawings, No.:

1-16 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.:

8

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP01/11326

☐ 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. 1-18.

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 17 and 18 (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. 1-18 (each partly) 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.

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

1. Statement

28
35

**INTERNATIONAL PRELIMINARY
EXAMINATION REPORT**

International application No. PCT/EP01/11326

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-14, 17 and 18 (partly)	* see point 2a on the separate sheet *
	No:	Claims	15, 16 and 18 (partly)	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	1-10, 13, 14, 17 and 18 (partly)	* see point 2a on the sep. sheet *
	No:	Claims	11, 12, 15, 16 and 18 (partly)	
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-16	* see point 2a on the separate sheet *
	No:	Claims		

2. Citations and explanations
see separate sheet

29
36

1. Comments with respect to item III

- a) **Claims 17 (as a whole) and 18 (partly) relate to subject-matter considered by this Authority to be covered by the provisions of Rule 67.1(iv) PCT.**
- (i) **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).**
- (ii) **For the assessment of said claims 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.**
- b) **Valuable technical data as to the immunogenicity of split enveloped virus preparations, i.e., their capability of inducing a potent immune response, when intranasally administered have been provided in the description (see Examples 2 and 3 on pages 24-29) only for viruses of the Paramyxoviridae family. Therefore, a sufficient support in the description appears to exist only for that part of the claimed subject-matter which relates to vaccine preparations which contain said viruses.** *

2. Comments with respect to item V

a) Preliminary remark

In view of the comments made at point 1 above, the following comments as to novelty and inventive step are made with respect to claims 1-18, insofar as the virus referred to therein belongs to the Paramyxoviridae family. Similarly, comments are made as to industrial applicability for the same parts

of the claimed subject-matter as defined in claims 1-16 only.

b) Document cited

Reference is made to the following documents which were cited in the international search report:

- # D1: *Seminars in Respiratory Infections*, 10(4), 1995, 282-7, XP001026636
- # D2: *Vaccine*, 12(14), November 1994, 1303-10, XP001026644
- # D3: *Developments in Biological Standardization*, 41, 1978, 195-207 XP001027713
- # D4: *Acta Veterinaria Scandinavia*, 17(4), 1976, 465-74 XP001027714
- # D5: *Applied Microbiology*, 22(3), 1971, 255-9 XP001027710
- # D6: *Biologicals*, 28(2), June 2000, 95-103 XP001026651
- # D7: WO 91/13281
- # D8: WO 01/21151

c) Novelty (Article 33(2) PCT)

- (i) The use of a split virus of the Paramyxoviridae family in the manufacture of a vaccine formulation for intranasal delivery or a method for protecting or treating a mammal comprising administering such a vaccine appears not to be disclosed in the state of the art. Therefore, the subject-matter of claims 1-10, 13, 17 and 18, insofar as said latter claim relates to such a use or method, may be considered to be new.
- (ii) It is agreed that in document D1 only subunit vaccines produced by detergent solubilization of PIV-3 are referred to (see the Chapter entitled "Inactivated Vaccines" on page 286). Therefore, a method of

81
38

producing a split virus of the Paramyxoviridae family as defined in claim 11, the only essential technical feature of said method being that the virus is split, has to be considered as not being disclosed in said document. As a result also the subject-matter of claim 11 may be considered to new. The same conclusion also applies *de facto* to the subject-matter of dependent claims 12 and 18, insofar as said latter claim is directed to a method as defined in either of claims 11 and 12.

- (iii) Claim 15 is indisputably directed, not to a 'combination' of a device and a vaccine, but to a device. As explained on page 12 of the description, intranasal delivery devices such as pressure threshold devices or such as a plastic disposable syringe with a tip, suitable for use with the present invention are known in the art, see further document D7 (as a whole) and D2 (Figure 1 on page 1304), respectively. Introducing in such a device a vaccine as defined in claims 1-10, whereas the technical features of said vaccine cannot be regarded as technical features of the device, cannot render novel said device. Therefore, the IPEA abides by its opinion that it has to be considered that the subject-matter of claims 15, 16 and 18, insofar as said latter claim relates to a device as defined in either of claims 15 and 16, lacks novelty.
- (iv) A kit such as defined in claim 14, i.e., comprising both a split virus of the Paramyxoviridae family and an intranasal delivery device appears not to be disclosed in the state of the art. Therefore, it may be considered that a kit as defined in claims 14 and 18, insofar as said latter claim is directed to a kit as defined in claim 14, is new.
- (v) To summarize, whereas the subject-matter of claims 1-14, 17 and 18 (insofar as said latter claim is not directed to a device), as defined at point 2a. above can be regarded as new, in contrast, the subject-matter of (a) claims 15, 16 and 18 (insofar as said latter claim is directed to a device) as defined at point 2a. above, is considered not to be new.

13

d) Inventive step (Article 33(3) PCT)

- (i) In view of the results presented in document D2 which focuses on split influenza virus and account being taken of the other cited prior documents, it may be considered that no direct extrapolation from the state of the art would have been made by a person skilled in the art which would have led him/her to envisage that a preparation composed of split virus belonging to that particular group of viruses which belong to the Paramyxoviridae may represent an efficient vaccine if intranasally administered. Therefore and in view of the results reported in the description with respect to vaccine preparations containing a split virus of said family, the subject-matter of **claims 1-11, 13, 17, and 18**, insofar as said latter claim relates to a use as defined in **claims 1-10 and 13** or a method as defined in **claim 17**), as defined at point 2a. above can be considered to involve an inventive step. The same conclusion may apply also to the subject-matter of **claims 14 and 18**, insofar as said claim is directed to a kit as defined in **claim 14**.
- (ii) It is not clear which unexpected technical effect could have been expected by a person skilled in the art from the addition of know surfactants such as TWEEN 80 or TRITON X100 to a vaccine formulation. Therefore, a method of producing a vaccine formulation as defined in **claim 12** cannot be considered as involving an inventive step over any combination of either of documents D1 and D3 (in which split measles virus (Paramyxoviridae) vaccine preparations are referred to (see pages 199-200 and Table VI on page 203) with any of documents D4 (which describes the use TritonX-100 in the preparation of a split hog cholera virus vaccine; see page 467), D5 (which describes the use of Tween 80 in the preparation of a split rubella virus vaccine; see page 255-6), and D6 (which describes the use of TritonX-100 in the preparation of a split influenza virus vaccine). Furthermore, as the fact that said vaccine formulation is optionally immunogenic in seropositive and seronegative individuals as referred to in **claim 18**, i.e., that said vaccine may be used in naïve and primed individuals, does not appear to be correlated with a particular procedure step to be added to the

method of either of **claims 11 and 12**, it is also not possible to consider that the subject-matter of **claim 18**, insofar as it is directed to a method as defined in either of **claims 11 and 12**, involves an inventive step.

(iii) To summarize, only the subject-matter of (a) **claims 1-10, 13, 14 and 17, and (b) claim 18**, insofar as said latter claim relates to (i) a use as defined in **claims 1-10 and 13**, (ii) a kit as defined in **claim 14**, or (iii) a method as defined in **claim 17**), as defined at point 2a. above can be considered to involve an inventive step.

e) Industrial applicability (Article 33(4) PCT)

The subject-matter of **claims 1-16** may be considered to be susceptible of industrial applicability.

f) Intermediate document

Should the priority appeared not to have been validly claimed, document D8 should be taken into consideration when assessing whether the subject-matter of **claims 11, 12, 15, 16 and 18** is new or involves an inventive step.

*patent
function*

Claims:

1. The use of a split enveloped virus preparation which is not a split *influenza* virus preparation in the manufacture of a vaccine formulation for intranasal delivery.
2. The use according to claim 1 wherein the split enveloped virus preparation is either singly or a mixture of respiratory syncytial virus, parainfluenza virus, measles and herpes simplex virus.
3. The use according to claim 1 or claim 2 wherein the split enveloped virus preparation comprises viral membrane fragments, viral membrane envelope proteins, viral matrix and nucleoproteins.
4. The use according to any one of claims 1 - 3 which additionally comprises one or more residual splitting agents.
5. The use according to claim 4 wherein the residual splitting agent is selected from the group consisting of laurth 9, NaDOC, Sarcosyl group, Tween 80™, and Triton X100™.
6. Use according to claim 5 wherein the splitting agent is NaDOC or Sarcosyl.
7. The use according to any one of claims 1 to 6 which additionally comprises a stabilising agent.
8. The use according to claim 7 wherein the stabilising agent is a surfactant.
9. The use according to 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. The use as claimed in any one of the preceding claims which additionally comprises an adjuvant.

11 A method of producing an intranasal vaccine formulation which is not a split *Influenza* virus preparation as claimed in any one of the preceding claims which comprises the steps of

- (a) splitting an enveloped virus; and
- (b) optionally admixing the split enveloped virus preparation with a stabilising agent; and
- (c) optionally admixing the split enveloped virus preparation with an adjuvant (carrier and/or immunostimulant).

12 A method of producing a vaccine formulation as claimed in Claim 11 wherein the stabilising agent is at least one surfactant selected from the group comprising polyoxyethylene sorbitan monooleate (TWEEN80™); t-octylphenoxypolyethoxyethanol (TRITON X100™); polyoxyethylene-9-lauryl ether.

13 Use of a split enveloped virus vaccine preparation, which is not a split *Influenza* virus preparation in the manufacture of an intranasal vaccine formulation for the prophylaxis or treatment of disease.

14 A kit for delivery of an intranasal vaccine formulation as claimed in any one of claims 1 - 10 comprising:

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

15 An intranasal delivery device comprising a vaccine according to any of claims 1-10.

16 A device according to claim 15 which is a pressure threshold device.

17 A method for protecting or treating a mammal susceptible to, or suffering from disease caused by an enveloped virus, the method comprising administering a vaccine according to claims 1-10 via a nasal route.

46
93

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

18

**PREPARACIÓN DE VIRUS CON ENVOLVENTE, DIVIDIDO, PARA
SUMINISTRO INTRANASAL**

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5

En particular, la presente invención se refiere a formulaciones de vacuna que comprenden preparaciones de virus con envoltente, divididos, que no son preparaciones de virus de *influenza* dividido, en la fabricación de una formulación de vacuna para suministro intranasal; a métodos de fabricación de dicha formulación; y al uso de esas vacunas en la profilaxis o la terapia de enfermedades.

15

20

PREPARACIÓN DE VIRUS CON ENVOLVENTE, DIVIDIDO, PARA
SUMINISTRO INTRANASAL

La presente invención se refiere a formulaciones
5 novedosas de vacuna, a métodos para fabricar dichas vacunas y el
uso de esas vacunas en la profilaxis o la terapia de enfermedades.
En particular, la presente invención se refiere a vacunas que
comprenden preparaciones de virus con envolvente, divididos.

Un virus con envolvente es aquél en el que el núcleo
10 del virus está rodeado por un revestimiento exterior, rico en
lípidos, que contiene proteínas virales.

En una modalidad particular, el virus con envolvente,
dividido, de la formulación de vacuna de la presente invención, se
deriva del virus sincicial respiratorio (RSV, acrónimo por su
15 designación en inglés: Respiratory Syncytial Virus). Los peligros
de infección por los virus con envolvente están ilustrados
mediante referencia a este virus RSV.

El virus sincicial respiratorio (RSV) humano es un
miembro de la familia *Paramyxoviridae* de los virus y provoca
20 enfermedades del tracto respiratorio inferior, particularmente en
niños pequeños y bebés. Los recientes informes sugieren que el
RSV es un patógeno importante también en los adultos, particular-
mente en las personas de edad avanzada.

RSV es un virus con envolvente, que tiene una genoma
25 de ácido ribonucleico (ARN) de filamento negativo, no
segmentado, con 15,222 nucleótidos, que codifica once ARN
mensajeros, cada uno de los cuales codifica un solo polipéptido.
Tres de las once proteínas son proteínas de superficie de
transmembrana: las proteínas G (fijación), F (fusión) y SH. Una

proteína es la proteína de matriz de virión (M); tres proteínas son componentes de la nucleocapsida (N, P y L) y dos proteínas son no estructurales (NS1 y NS2). Hay otras dos proteínas, M2-1 y M2-2. Existen dos subgrupos de RSV antigénicamente distintos, designados subgrupos A y B. La caracterización de las cepas de estos subgrupos ha determinado que las principales diferencias residen en las proteínas G, mientras que se conservan las proteínas P.

El virus sincicial respiratorio (RSV) ocurre en brotes de temporada, llegando al pico durante el invierno en los climas templados, y durante la estación lluviosa en los climas más cálidos.

El RSV es el principal causante de enfermedades serias en el tracto respiratorio inferior, en niños. Se estima que el 40 a 50 por ciento de los niños hospitalizados con bronquiolitis, y el 25 por ciento de los niños hospitalizados con neumonía, son hospitalizados como resultado directo de infecciones por RSV. Usualmente ocurre la infección primaria con RSV en niños de menos de un año de edad; el 95 por ciento de los niños tienen evidencia serológica de una infección anterior a los dos años de edad, y el 100 por ciento de la población, cuando llega a la etapa adulta.

En los bebés y en los niños pequeños, la infección avanza desde el tracto respiratorio superior al inferior, aproximadamente en el 40 por ciento de los casos, y la presentación clínica es la de bronquiolitis o neumonía. Los niños de dos a seis meses de edad presentan el máximo riesgo de desarrollar manifestaciones serias de infección por RSV (falla primariamente respiratoria); sin embargo, los niños de cualquier

edad, con enfermedad cardíaca o pulmonar subyacente, los bebés prematuros y los bebés inmunocomprometidos, tienen además riesgo de complicaciones serias.

Ocorre reinfección sintomática en toda la vida, y se ha
5 vuelto cada vez más aparente que el RSV es un patógeno importante también en los adultos, especialmente en los ancianos.

La infección con RSV casi seguramente poco diagnosticada en los adultos, parcialmente debido a que se considera que es una infección infantil. Consecuentemente, no se
10 busca la evidencia del virus en los adultos, a fin de explicar las enfermedades respiratorias. Además, es difícil identificar el RSV en individuos que tienen algún grado de inmunidad parcial al virus, como sucede en la gran mayoría de los adultos. Los adultos jóvenes a de mediana edad desarrollan típicamente un síndrome
15 persistente, parecido al resfriado, cuando son infectados con RSV. Los individuos de más edad pueden desarrollar un síndrome respiratorio prolongado que virtualmente no puede distinguirse de la influenza, con síntomas en el tracto respiratorio superior que pueden ir acompañados por implicaciones en el tracto respiratorio
20 inferior, incluyendo la neumonía. Las poblaciones de edad avanzada, institucionalizadas, son de particular preocupación, debido a que comprenden números elevados de individuos susceptibles, agrupados. La difusión de la infección en dicha población, muchos de cuyos individuos tienen múltiples problemas
25 médicos que pueden predisponerlos a un curso más severo de la enfermedad, es difícil de controlar.

Además, los informes de estudios recientes, que evalúan el impacto de la infección por RSV como la causa de hospitalización en adultos y en personas ancianas sanas que

viven en comunidad, señalan adicionalmente que la infección por RSV tiene un papel importante en las enfermedades severas del tracto respiratorio inferior en esas poblaciones. Se ha identificado el RSV como uno de los cuatro patógenos más
5 comunes que provocan enfermedades severas en el tracto respiratorio inferior, que dan por resultado la hospitalización de adultos. También se demostró que las infecciones serias por RSV en ancianos no están limitadas a los ancianos ni a situaciones de brotes. Más bien la infección por RSV es una causa predecible
10 de enfermedades serias entre pacientes de edad avanzada que residen en comunidad. Como las hospitalizaciones por Influenza A, las relacionadas con infecciones por RSV estaban asociadas con morbilidad sustancial, según se evidencia por permanencias prolongadas en el hospital, altas tasas de admisión en cuidados
15 intensivos, y altas tasas de apoyo respiratorio.

Esos estudios señalan la necesidad médica y económica de una vacuna efectiva que pueda prevenir complicaciones severas de infección por RSV, particularmente en
bebés, adultos y en ancianos sanos e institucionalizados, que
20 viven en comunidad.

Existen peligros similares con otros virus con envoltente y, por lo tanto, sigue habiendo necesidad de protección efectiva contra la infección y la enfermedad provocada por esos virus.

25 La presente invención provee el uso de una preparación de virus con envoltente, dividido, que no es una preparación de virus de *Influenza* dividido, en la preparación y la fabricación de una vacuna formulada para suministro intranasal.

De preferencia la preparación comprende un excipiente

farmacéuticamente aceptable.

Las formulaciones de vacuna de la presente invención se derivarán de virus con envolvente, que son capaces de ser divididos. Los virus con envolvente pueden derivarse de una gran
5 variedad de fuentes, incluyendo virus de origen humano o animal. Cuando el virus no es de origen humano, tal como de origen bovino, de preferencia el virus es un virus recombinante.

Es preferible que las formulaciones de vacuna de la presente invención sean capaces de simular una respuesta
: 10 inmunológica protectora contra el virus con envolvente, después del suministro.

Dentro de los términos de la presente invención, los virus incluyen todos los virus con envolvente, excluyendo cualquier virus de *influenza*) ilustrados por los siguientes, pero sin
15 limitación a ellos:

- 1) Paramixovirus, tales como el virus sincicial respiratorio (A y B), el virus de parainfluenza (tal como PIV-3), el metaneumovirus, el virus del sarampión, el virus de paperas;
- 2) el virus del herpes, tal como el virus de Epstein-Barr, el
20 virus de *herpes simplex*, citomegalovirus;
- 3) flavivirus, tales como el virus del dengue, el virus de la fiebre amarilla, el virus de encefalitis transmitido por la garrapata; el virus de la encefalitis japonesa;
- 4) togavirus, tales como el virus de la rubéola, y los virus de
25 encefalitis equina oriental, occidental y venezolana; y
- 5 retrovirus, tales como el virus de inmunodeficiencia humana.

La formulación de vacuna de la presente invención puede comprender opcionalmente más de una preparación de virus dividido.

La formulación de vacuna de la presente invención comprende opcionalmente uno o más antígenos, procedentes de patógenos, en combinación con la preparación dividida, para proveer protección adicional contra la enfermedad. Los antígenos
5 adecuados, que no necesitan proceder de preparaciones divididas, incluyen, por ejemplo, antígenos de cualquiera de los virus mencionados más arriba, y patógenos que provocan enfermedades respiratorias, tales como *Streptococcus pneumoniae*.

Se lleva a cabo la división del virus rompiendo o
10 fragmentando los virus enteros, infecciosos (de tipo natural o atenuado) o no infecciosos (por ejemplo, inactivados), con una concentración rompedora de un agente de división que en general, aunque no necesariamente, es un agente tensioactivo. El virus que se va a dividir también puede ser un virus recombinante
15 quimérico que tiene elementos inmunogénicos procedentes de más de un virus diferente. La ruptura da por resultado una solubilización total o parcial de todas las proteínas virales que alteran la integridad del virus.

Adecuadamente se puede obtener un virus dividido
20 poniendo en contacto el virus con un agente de división, de acuerdo con la presente invención, para romper totalmente la envoltente viral. Es preferible que otras proteínas virales queden solubilizadas total o parcialmente. La pérdida de integridad después de la división, hace no infeccioso al virus, lo que se
25 puede determinar fácilmente mediante análisis de titulación *in vitro*. Una vez que ha sido rota, las proteínas de la envoltente viral generalmente ya no están asociadas con los viriones enteros intactos. De preferencia otras proteínas virales están solubilizadas total o parcialmente y, por lo tanto, no están

asociadas, o sólo están asociadas parcialmente, con los viriones enteros intactos, después de la división.

El efecto del agente de división sobre la envoltura viral y sobre las proteínas del virus, puede ser seguido por la migración del virus dividido y las proteínas virales, en experimentos de amortiguación en sacarosa, con visualización por medio del análisis de mancha Western y microscopía electrónica, tal como se describe en la presente.

La preparación de vacunas divididas, de conformidad con la presente invención, puede implicar los pasos adicionales de separar los agentes de división y algo o la mayoría del material lípido viral. El proceso para la preparación del virus con envoltura, dividido, puede incluir adicionalmente un número de diferentes pasos de filtración y/o de otra 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 UV, que puede ser efectuado antes o después de la división. Se puede llevar a cabo el proceso de división como un proceso intermitente, continuo o semi-continuo.

Las vacunas divididas de conformidad con la presente invención por lo general contienen fragmentos de membrana y proteínas de la envoltura de membrana, así como proteínas que no son de membrana, tales como la proteína de matriz viral y nucleoproteína, en ausencia de cantidades significativas de viriones enteros. Las vacunas divididas de acuerdo con la presente invención por lo general contienen la mayoría o la totalidad de las proteínas estructurales del virus, aunque no

necesariamente en las mismas proporciones con que ocurren en el virus entero. Las preparaciones de virus dividido, preferidas, comprenden por lo menos la mitad de las proteínas estructurales virales, de preferencia la totalidad de dichas proteínas. Por otra parte, las vacunas de subunidad consisten esencialmente de una proteína viral fuertemente purificada, o unas cuantas de estas proteínas. Por ejemplo, una vacuna de subunidad podría contener proteínas superficiales virales purificadas, que se sabe que son las responsables de provocar la aparición de los anticuerpos deseados que neutralicen el virus, cuando se efectúa la vacunación.

En esta invención se puede usar diversos agentes de división, tales como los agentes tensioactivos no iónicos e iónicos, así como otros diversos reactivos. Los ejemplos de agentes de división útiles en el contexto de la presente invención incluyen los siguientes:

1. Ácidos biliares y sus derivados. Los ácidos biliares incluyen: ácido cólico, ácido desoxicólico, ácido quenodesoxicólico, ácido litocólico, ácido ursodesoxicólico, ácido hiodesoxicólico y sus derivados, como los derivados glicólicos, táuricos, amidopropil-1-propansulfónicos, amidopropil-2-hidroxi-1-propansulfónico de los ácidos biliares mencionados más arriba, o N,N-bis(3D-gluconoamidopropil)desoxicolamida. Un ejemplo particular es el desoxicolato de sodio (NaDOC).
2. Agentes tensioactivos no iónicos, como octoxinóles (la serie Triton™), éteres polioxietilénicos, tales como monooleato de polioxietilen-sorbitán (Tween 80™) y éteres o ésteres de polioxietileno de la fórmula general (I):

56
53(I) $\text{HO}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-A-R}$

en la que n es de 1 a 50, A es una ligadura o $-\text{C}(\text{O})-$; R es alquilo de 1 a 50 átomos de carbono o fenilalquilo de 1 a 50 átomos de carbono, y las combinaciones de dos o más de éstos. Son ejemplos particulares: Tween 80™, Triton X-100™ y laureth 9;

3. Alquilglicosidas o alquiltioglicosidas, en las que la cadena alquilo tiene entre 6 y 18 átomos de carbono, típicamente entre 8 y 14 átomos de carbono, la porción azúcar es cualquier pentosa o hexosa o sus combinaciones con diferentes ligaduras, como $1 \rightarrow 6$, $1 \rightarrow 5$, $1 \rightarrow 4$, $1 \rightarrow 3$, $1-2$. La cadena alquilo puede ser saturada, no saturada y/o ramificada;

4. Derivados de 3 anterior, en los que uno o más de los grupos hidroxilo, de preferencia el grupo 6-hidroxilo está/están modificado(s), como ésteres, etoxilatos, sulfatos, éteres, carbonatos, sulfosuccinatos, isetionatos, carboxilatos de éter, compuestos de amonio cuaternario;

5. Azúcares de acilo, donde la cadena acilo tiene entre 6 y 18 átomos de carbono, típicamente entre 8 y 12 átomos de carbono; la porción azúcar es cualquier pentosa o hexosa, o sus combinaciones, con diferentes ligaduras, como $1 \rightarrow 6$, $1 \rightarrow 5$, $1 \rightarrow 4$, $1 \rightarrow 3$, $1-2$. La cadena acilo puede ser saturada, insaturada y/o ramificada;

6. Sulfobetainas de la estructura $\text{R-N,N-(R1,R2)-3-amino-1-propansulfonato}$, donde R es cualquier cadena alquilo o cadena arilalquilo entre 6 y 18 átomos de carbono, típicamente entre 8 y 16 átomos de carbono. La cadena

alquilo R puede ser saturada, insaturada y/o ramificada. Las cadenas de alquilo R1 y R2 tienen entre 1 y 4 átomos de carbono, típicamente, un átomo de carbono;

- 5 7. Betaínas de la estructura R-N,N-(R1,R2)-glicina, donde R es cualquier cadena de alquilo de entre 6 y 18 átomos de carbono, típicamente entre 8 y 16 átomos de carbono. La cadena de alquilo pueden ser saturada, insaturada y/o ramificada. R1 y R2 son cadenas de alquilo entre 1 y 4 átomos de carbono, típicamente 1 átomo de carbono;
- 10 8. Éter alquílico de polioxietileno de estructura R-(-O-CH₂-CH₂-)_n-OH, en la que R es cualquier cadena de alquilo de entre 6 y 20 átomos de carbono, típicamente entre 8 y 14 átomos de carbono. La cadena de alquilo puede ser saturada, insaturada y/o ramificada; n es entre 5 y 30, típicamente entre 8 y 25;
- 15 9. N,N-dialquil-glucamidas, de la estructura R-(N-R1)-glucamida, donde R es cualquier cadena de alquilo de entre 6 y 18 átomos de carbono, típicamente entre 8 y 12 átomos de carbono. La cadena de alquilo puede ser saturada, insaturada y/o ramificada o cíclica. R1 y R2 son cadenas de alquilo de entre 1 y 6 átomos de carbono, típicamente de un átomo de carbono. La porción azúcar podría estar modificada con pentosas o hexosas;
- 20 10. Hecameg: (6-O-(N-heptil-carbamoyl)-metil-alfa-D-glucopiranosida);
- 25 11. Alquilfenoxipolietoxietanol de la estructura R-C₆H₄-O-(-CH₂-CH₂-)_n-OH, en la que R es cualquier cadena de alquilo entre 6 y 18 átomos de carbono, típicamente de 8 átomos de carbono. La cadena de alquilo puede ser saturada,

Insaturada y/o ramificada ($N \geq 3$);

12. Compuestos de amonio cuaternario de la estructura R, $-N^+(-R_1,$

5 $-R_2, -R_3)$; en la que R es cualquier cadena de alquilo de entre 6 y 20 átomos de carbono, típicamente, de 20 átomos de carbono. La cadena de alquilo puede ser saturada, insaturada y/o ramificada. R1, R2 y R3 son cadenas de alquilo de entre 1 y 4 átomos de carbono, típicamente, de un átomo de carbono;

10 13. Sarcosilo: sal de Na de N-laurilsarcosina;

14. CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) o Cetavlon.

Son muy preferidos NaDoc y Sarcosilo. Los agentes de división son incubados adecuadamente a la temperatura ambiente con el virus que se va a dividir, por ejemplo, durante la noche, para efectuar la división. Se puede usar combinaciones de
15 agentes de división, como sea apropiado.

La preparación de vacuna dividida de preferencia contiene por lo menos un agente tensioactivo que, en particular, puede ser un agente tensioactivo no iónico. El agente
20 tensioactivo no iónico o los agentes tensioactivos no iónicos pueden ser residuales del proceso de división, y/o pueden ser añadidos al virus después de la división. Se cree que el material de antígeno dividido es estabilizado en presencia de un agente tensioactivo no iónico, aunque se entenderá que la presente
25 invención no depende necesariamente de que así sea en efecto. La estabilización adecuada de los agentes tensioactivos no iónicos incluyen los octoxinóles (la serie Triton™), éteres polioxietilénicos, tales como monooleato de polioxietilen-sorbitán (Tween 80™) y los éteres o ésteres de polioxietileno de la fórmula

general (I):



en la que n es de 1 a 50; A es una ligadura o $-C(O)-$, R es alquilo de 1 a 50 átomos de carbono o fenilalquilo de 1 a 50 átomos de carbono, y combinaciones de dos o más de éstos.

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

Los agentes tensioactivos no iónicos preferidos incluyen, pero sin restricción a ellos: éteres polioxietilénicos de la fórmula general (I) anterior, en particular: éter 9-laurílico de polioxietileno, éter 9-estearílico de polioxietileno, éter 8-estearílico de polioxietileno, éter 4-laurílico de polioxietileno, éter 35-laurílico de polioxietileno y éter 23-laurílico de polioxietileno. El más preferido es el éter polioxietilénico éter 9 laurílico de polioxietileno (laureth 9). Los términos o nombres alternativos para el éter laurílico de polioxietileno están descritos en el registro CAS. El número del registro CAS para el éter 9-laurílico de polioxietileno es 9002-92-0. Los éteres polioxietilénicos, tales como el éter laurílico de polioxietileno están descritos en el índice Merck (12a. edición, anotación 7717, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, E. U. A.; ISBN 0911910-12-3). Laureth 9 es formado haciendo reaccionar óxido de etileno con alcohol dodecilico, y tiene un promedio de nueve unidades óxido de etileno.

De preferencia la concentración final del agente tensioactivo estabilizador, presente en la formulación final de vacuna, está entre 0.001 y 20 por ciento, más preferible, de 0.01 a

10 por ciento, y lo que más se prefiere, hasta aproximadamente 2 por ciento (en peso/volumen). Cuando está presente uno o más agentes tensioactivos, éstos generalmente están presentes en la formulación final a una concentración hasta de 2 por ciento cada uno, en general, hasta una concentración aproximada de 1 por ciento cada uno, típicamente a una concentración hasta de alrededor de 0.6 por ciento cada uno; y más típicamente, en vestigios aproximadamente de 0.2 por ciento o 0.1 por ciento de cada uno. Puede estar presente cualquier mezcla de agentes tensioactivos en las formulaciones de vacuna de acuerdo con la presente invención.

Se puede producir el virus con envoltente mediante duplicación en un substrato de célula adecuado, en suero o en un proceso libre de suero. Se puede producir virus desarrollados en cultivo de tejido, por ejemplo, en células humanas, tales como MRC-5, WI-38, HEP-2, o en células de simio, tales como AGMK, Vero, LLC-Mk₂, LLC-Mk2, FRhL, FRhL-2, o en células bovinas, tales como MDBK o en células caninas, tales como MDCK, o en células primarias, tales como fibroblastos de embrión de pollo, o cualquier otro tipo de célula, adecuado para la producción de un virus para fines de vacuna, incluyendo los clones derivados de las líneas de células mencionadas más arriba.

Se combina adecuadamente la preparación de vacuna dividida con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser aquellos que son convencionales en el campo de la preparación de vacunas. Los excipientes usados en cualquier formulación dada de vacunas serán compatibles tanto entre sí como con los ingredientes esenciales de la composición, de manera que no haya

interacción que perjudique el funcionamiento de los ingredientes y de los agentes activos, si los hay. Todos los excipientes, por supuesto, pueden ser no tóxicos, o tener una pureza suficiente para hacerlos adecuados para uso humano. Los ejemplos
5 adecuados de excipientes son bien conocidos en la técnica.

La formulación de vacunas también puede incluir, de preferencia, un adyuvante que puede ser un portador y/o un inmuno-estimulante. El adyuvante puede ser residual respecto al proceso de división, y/o se puede añadir al virus después de la
10 división. Los adyuvantes adecuados para uso en las vacunas de la presente invención son bien conocidos en la técnica.

Así pues, otro aspecto de la presente invención provee el uso de una preparación de vacuna de virus con envoltente, dividido, que no es una preparación de virus de *Influenza* dividido,
15 en combinación con un adyuvante, en la fabricación de una formulación de vacuna, para suministro intranasal. Se prefiere que la preparación comprenda un excipiente farmacéuticamente aceptable.

Se puede usar las preparaciones de vacuna de la presente invención para proteger o tratar un mamífero susceptible
20 a, o que sufre de, una enfermedad, por medio de la administración de la vacuna a través de una ruta nasal. La invención se extiende a dichos métodos de tratamiento y de protección.

Además de hacer a un lado el requisito de las
25 inyecciones dolorosas y el efecto negativo asociado sobre el cumplimiento del paciente, debido al "miedo a la aguja", la vacunación mucosal, tal como mediante un método intranasal es atractivo, puesto que se ha demostrado en animales que la administración mucosal de antígenos tiene buena eficiencia al

inducir respuestas protectoras en las superficies mucosales, que es la ruta de entrada de muchos patógenos. Además, se ha sugerido que la vacunación mucosal, tal como la vacunación intranasal puede inducir inmunidad mucosal no solamente en la mucosa nasal, sino también en sitios mucosales distantes, tales como la mucosa genital. A pesar de mucha investigación en este campo, sigue sin identificarse las vacunas seguras y efectivas para el suministro intranasal, que sean adecuadas para uso en humanos.

10 La administración intranasal de acuerdo con la presente invención puede darse en forma de gotas, de rocío o en forma de polvo seco. Las formulaciones de vacuna nebulizadas o en aerosol forman también parte de la presente invención.

Se puede usar en la presente invención cualquier adyuvante adecuado, y en cualquier forma adecuada, tal como una solución, una solución no vesicular, una suspensión o un polvo. Los adyuvantes preferidos incluyen los ejemplificados en WO 99/52549, cuyos contenidos totales quedan incorporados aquí por medio de esta referencia. Los adyuvantes preferidos incluyen, pero sin limitación a ellos: Tween 80™, Triton X-100™, laureth 9 y sus combinaciones.

Se puede combinar ventajosamente los agentes tensioactivos no iónicos con un inmunoestimulante, tal como un derivado no tóxico de lípido A, que incluye los descritos en US 4,912,094 y en GB 2,220,211, incluyendo derivados no tóxicos del lípido A monofosforílico y difosforílico, tal como el lípido A monofosforílico 3-des-O-acilado (3D.MPL) y el lípido difosforílico 3-des-O-acilado. Una combinación preferida es la del Laureth-9 combinado con 3D-MPL. Los inmunoestimulantes anteriores

también pueden ser usados en formulaciones sin agentes tensioactivos no iónicos, cuando es apropiado.

Una forma preferida de 3D-MPL tiene la forma de una emulsión que tiene un tamaño pequeño de partícula, de menos de 0.2 μm de diámetro; y su método de fabricación, están descritos en WO 94/21292. Las formulaciones acuosas que comprenden el lípido A monofosforílico y un agente tensioactivo han sido descritas en WO 98/43670-A2.

Los adyuvantes derivados del lipopolisacárido bacteriano que van a ser formulados en las composiciones de la presente invención pueden ser purificados y procesados a partir de fuentes bacterianas o, alternativamente, pueden ser sintéticos. Por ejemplo, el lípido A monofosforílico purificado está descrito en Ribi y coautores, 1986 (1986, *Immunology and Immunopharmacology of bacterial endotoxins*, Plenum Publ. Corp., NY, p 407-419) y el lípido A monofosforílico o difosforílico 3-O-desacilado, derivado de *Salmonella sp.*, está descrito en GB 2,220,211 y en US 4,912,094. Otros lipopolisacáridos purificados y sintéticos han sido descritos (Hilgers y coautores, 1986, *Int. Arch. Allergy. Immunol.*, 79(4): 392-6; Hilgers y coautores, *Immunology*, 60(1): 141-6; y en EP 0 549 074 B1). Un adyuvante de polisacárido bacteriano particularmente efectivo es 3D-MPL.

Consecuentemente, los derivados de LPS que pueden ser usados en la presente invención, son aquellos inmunoestimulantes que son de estructura similar a la de LPS o MPL o 3D-MPL. En otro aspecto de la presente invención los derivados de LPS pueden ser un monosacárido acilado, que es una subporción de la estructura anterior de MPL.

En otra modalidad más de la presente invención el

adyuvante es una toxina ADP-ribosilante o un mutante de ella. Los ejemplos de tales toxinas son la toxina térmicamente lábil (LT), de *E. coli*, y sus mutantes, tales como LTR192G, y los fragmentos de esas toxinas, tales como el componente que se une a gangliosida (LTB).

Otros adyuvantes preferidos adicionales incluyen los adyuvantes de saponina, tales como QS21.

Un sistema mejorado implica la combinación de un derivado de lípido A, no tóxico y un derivado de saponina, particularmente la combinación de QS21 y 3D-MPL, como se describió en WO 94/00153, o una composición reactógena en la que el QS21 es inactivado con colesterol, está descrito en WO 96/33739.

Los dispositivos preferidos para administración intranasal de las vacunas de acuerdo con la presente invención son dispositivos rociadores. Los dispositivos rociadores nasales adecuados pueden ser obtenidos en el comercio, de Becton Dickinson, Pfeiffer GmbH y Valois.

Los dispositivos rociadores preferidos para uso intranasal no dependen para su funcionamiento de la presión aplicada por el usuario. Los dispositivos con umbral de presión son particularmente útiles, puesto que se libera el líquido desde la boquilla sólo cuando se alcanza una presión de umbral. Estos dispositivos facilitan obtener un rocío con un tamaño de gota regular. Los dispositivos con umbral de presión, adecuados para uso con la presente invención son conocidos en la técnica y están descritos, por ejemplo, en WO 91/13281 y EP 311 863 B. Tales dispositivos actualmente pueden ser obtenidos de Pfeiffer GmbH y también están descritos por Bommer, R., *Advances in Nasal drug*

delivery Technology, Pharma-ceutical Technology Europe, septiembre de 1999, p 26-33.

Los dispositivos intranasales preferidos producen gotas (medidas usando agua como líquido, en la escala de 1 a 500 μm .

5 Por debajo de 10 μm hay el riesgo de inhalación; por lo tanto, es conveniente que tengan no más de alrededor del 5 por ciento de las gotas, un tamaño inferior a 10 μm .

El suministro de dosis doble es un aspecto preferido adicional de un sistema de suministro intranasal para uso con las
10 vacunas de acuerdo con la presente invención. Los dispositivos de dosis doble contienen dos subdosis de una sola dosis de vacuna, una subdosis para administración a cada fosa nasal.

La invención provee también un dispositivo de suministro intranasal que comprende una formulación de vacuna
15 dividida de la presente invención.

La presente invención provee en otro aspecto más, un equipo farmacéutico que comprende un dispositivo de administración intranasal como el descrito aquí, que comprende un dispositivo de administración intranasal y una formulación de
20 vacuna separada, para uso con ese dispositivo.

Este aspecto a la presente invención no está limitado necesariamente al suministro por aspersión de formulaciones líquidas. Las vacunas de acuerdo con la invención pueden ser administradas en otras formas, por ejemplo, como un polvo.

25 Las formulaciones de vacuna de la presente invención pueden ser usadas tanto para propósitos profilácticos como para propósitos terapéuticos. Consecuentemente, la presente invención provee un método para tratar un mamífero susceptible a, o que sufre de, una enfermedad infecciosa. En otro aspecto de la

presente invención se provee una vacuna como la descrita aquí, para uso en medicina. La preparación de vacuna generalmente está descrita en *New Trends and Developments in Vaccines*, editado por Voller y otros, University Park Press, Baltimore, Maryland, E. U. A., 1978.

Se puede administrar vacunas en cualquier régimen de dosificación adecuado, tal como una dosis o un régimen de dos dosis. Se puede usar la vacuna en poblaciones simples y en poblaciones ya sensibilizadas, o sea, en individuos seronegativos y seropositivos.

Se prefiere que la formulación comprenda un adyuvante y/o se administre a individuos ya sensibilizados por exposición al virus.

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

- (a) dividir un virus con envoltente;
- (b) mezclar opcionalmente la preparación de virus con envoltente, dividido, con un agente estabilizador; y
- (c) mezclar opcionalmente la preparación de virus con envoltente, dividido, con un adyuvante (donde el adyuvante también puede ser un portador y/o un inmunoestimulante).

Adecuadamente el método comprende los pasos (a) y (b), los pasos (a) y (c) o los pasos (a), (b) y (c). Adecuadamente, el agente estabilizador que comprende por lo menos un agente tensioactivo seleccionado del grupo que consiste de monooleato de polioxietilen-sorbitán (TWEEN 80™); ter-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X100™); éter 9-laurílico de polioxietileno.

Opcionalmente, la vacuna producida de esta manera es mezclada con un portador adecuado.

La invención se extiende también a métodos para dividir virus con envoltente como los descritos aquí, que
5 comprenden el tratamiento del virus con un agente de división adecuado.

La presente invención está ilustrada, aunque no limitada, por las siguientes figuras y los siguientes ejemplos, en los que:

10 La figura 1 ilustra una mancha Western de RSVA dividido, con un anticuerpo anti-F.

La figura 2 ilustra una mancha Western de RSVA dividido con un anticuerpo anti-M2.

La figura 3 ilustra una mancha Western de RSVA
15 dividido con un anticuerpo G.

La figura 4 ilustra una mancha Western de RSVA dividido con un anticuerpo anti-N.

La figura 5 ilustra material de partida del virus RSV/A, visualizado mediante EM.

20 La figura 6 ilustra el virus RSV/A dividido con NaDOC, visualizado por medio de EM.

La figura 7 ilustra material de partida de virus PIV, visualizado por medio de EM.

La figura 8 ilustra el virus PIV 3 dividido con NaDOC,
25 visualizado mediante EM.

La figura 9 ilustra el material de partida de virus VHS2, visualizado mediante EM.

La figura 10 ilustra el virus VHS2 dividido con sarcosilo, visualizado mediante EM.

La figura 11 ilustra los títulos de anticuerpo anti-FG (ELISA) (Post II) en ratones sensibilizados, inmunizados con RSV dividido, mediante rutas intramuscular o intranasal.

La figura 12 ilustra los títulos (Post II) de anticuerpo
5 neutralizante anti-RSV/A, en ratones sensibilizados, inmunizados con RSV dividido, por rutas intramuscular o intranasal.

La figura 13 ilustra las respuestas (Post II) de isotipo de IgG anti-FG en ratones sensibilizados, inmunizados con RSV dividido, mediante rutas intramuscular o intranasal.

10 La figura 14 ilustra los títulos (Post I) de anticuerpo anti-FG (ELISA) en ratones sensibilizados, inmunizados con RSV dividido, por las rutas intramuscular o intranasal.

La figura 15 ilustra los títulos de anticuerpo anti-FG (ELISA) en ratones no sensibilizados, inmunizados con RSV
15 dividido por ruta intranasal; y

La figura 16 ilustra los títulos de anticuerpo neutralizador de anti-RSV/A en ratones no sensibilizados, inmunizados con RSV dividido, por ruta intranasal.

20

EJEMPLO 1

GENERACIÓN DE VIRUS DIVIDIDOS

Se divide virus con envoltente, derivados de una variedad de familias de virus, mediante la adición de agentes de
25 división, tales como agentes tensioactivos. Se evalúa la división por medio de la caracterización de la migración de los virus divididos en gradientes o cojines de sacarosa, con visualización mediante análisis SDS-PAGE y por examen directo de los productos virales divididos, usando evaluación por microscopio

electrónico.

Los virus divididos descritos en este ejemplo incluyen representantes de una variedad de familias virales con envoltente. Por ejemplo, se evalúa miembros de la familia *Paramyxoviridae* 5 (virus sincicial respiratorio A y B, virus-3 de parainfluenza, virus de paperas y virus de sarampión), familia *Togaviridae* (virus de la rubéola) y la familia *Herpesviridae* (virus de Epstein Barr, citomegalovirus o virus de *herpes simplex*).

El acto de romper la partícula viral (división) se logra 10 por la adición de un agente de división, tal como un agente tensioactivo, a concentraciones solubilizadoras para las preparaciones virales libres de células. En particular se usa como agentes tensioactivos los ácidos biliares y las alquilglicosidas. Los agentes tensioactivos, solos o en diversas combinaciones, son 15 añadidos e incubados, para permitir que el proceso siga hasta completarse.

Se efectúa la evaluación de la división eficiente, inicialmente, usando un gradiente de sacarosa o una centrifugación de cojín. Brevemente, se aplica muestras tratadas 20 y no tratadas con agente tensioactivo a gradientes/cojines de sacarosa, y se analiza las fracciones en geles SDS-PAGE. La migración de todos los tipos de proteínas de virión, en las fracciones solubles indican una división eficiente. Las muestras consideradas eficientemente divididas por el análisis de sacarosa- 25 SDS-PAGE son analizadas adicionalmente por microscopía electrónica. Se visualiza las muestras usando técnicas de tinción negativa estándar.

Se llevó a cabo los siguientes experimentos específicos de división, en RSV, HSV y PIV.

1.1.- Condiciones del cultivo de células

Se reprodujo RSV/A/largo tipo natural, humano y PIV-3 tipo natural, humano, en células VERO, en un proceso
5 estacionario libre de suero. Antes de la infección se desarrolló células VERO durante cuatro días hasta confluencia. Se adaptó las condiciones de producción de virus a cada virus: MOI 0.03, 4 días, para RSV/A; MOI 0.01, 3 días, para HSV2 a 35°C, y MOI 0.01, 5 días, para PIV-3 a 37°C. El día de la cosecha se recuperó
10 los fluidos de célula después de lisis y de la adición del estabilizador, y se almacenó inmediata-mente a -70°C.

1.2.- Purificación del virus

Después de clarificar por centrifugación a 1,000 x g
15 durante 10 minutos, se formó las partículas de virus a pellas a partir del sobrenadante, mediante precipitación con PEG 6000. Se volvió a suspender la pella en regulador Tris 50 mM-NaCl 50 mM-MgSO₄ 2 mM, pH 7.5, seguido por un tratamiento con benzonasa. Se ultrafiltró esta solución en una membrana AGT de 500 kD
20 contra 5 volúmenes de salina regulada con fosfato, y luego se diafiltró contra 5 volúmenes de regulador fosfato, pH 7.5.

Se produjo partículas virales intactas, como se confirma mediante EM, y centrifugación en un cojín de sacarosa, tal como se describe aquí. Se determinó la concentración de la
25 proteína.

1.3.- División del virus

Se dividió las partículas virales por adición de un agente de división a la preparación viral libre de células.

Para que sea efectivo, se debe utilizar un detergente por encima de su concentración micelar crítica, cmc. Todos los detergentes fueron usados a una concentración final por encima de su valor cmc. Se estudió la razón D/P (razón
5 detergente/proteína). Se logró la división satisfactoriamente con una razón $D/P \geq 25$, que es la preferida.

Se usó los siguientes detergentes a una concentración de 2 por ciento para dividir las partículas de virus: desoxicolato de sodio, Sarkosyl, Plantacare y Laureth 9.

10 Después de la división se dializó las soluciones contra regulador de formulación (PO_4 10 mM/NaCl 150 mM, pH 7.5), para eliminar el exceso de detergente.

Se resume el proceso de división a continuación para el RSV, a manera de ejemplo.

15 **RSV-A: Diagrama de flujo de la purificación del virus.**

Clarificación de la cosecha

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

→ Sobrenadante clarificado

20 ↓

Precipitación en PEG 6000 al 10%

Agitación lenta durante 1 hora 30 minutos a +4°C

Centrifugación a 3500 RPM (100 x g) – 20 minutos

Pella suspendida de nuevo en regulador Tris 50 mM-NaCl 50 mM-

25 $MgSO_4$ 2mM, pH 7.5.

↓

Tratamiento con benzonasa

a 125 unidades/mL

Mínimo 4 horas de incubación con agitación

↓

ULTRAFILTRACIÓN: AGT-VAGE4A-500 kD-420 cm³

5 volúmenes contra PO₄(Na) 10 mM-NaCl 150 mM pH 7.5

seguidos por 5 volúmenes de PO₄(Na) 20 mM, pH 7.5

5

↓

División

Adición de detergente ==> ≤ 2% final – incubación O/N a

temperatura ambiente, bajo agitación lenta

↓

10

Clarificación

**Filtración de extremo cerrado en Sartopure 300 (GF2-profundidad
del filtro 1.2 µm)**

↓

ULTRAFILTRACIÓN: eliminación del detergente – concentración

15

4 volúmenes de PO₄(Na) 20 mM, pH 7.5,

luego 5 volúmenes de PO₄(Na) 10 mM/NaCl 150 mM, pH 7.5

↓

Volumen dividido

20

1.4.- Caracterización del virus dividido

**Se determinó la integridad de los virus de partida y la
calidad de la división mediante ultracentrifugación, en un cojín de
sacarosa al 30 por ciento (1 hora a 50,000 RPM en un rotor
Beckman TL100). Se analizó las fracciones mediante análisis de
manchas Western específicos; se efectuó microscopía electrónica
y título de infectividad en algunas de esas fracciones.**

25

1.4.1.- Ultracentrifugación

**Después de llenar a la mitad un tubo de centrífuga con
solución de sacarosa al 30 por ciento (450 µL), se tendió suave y**

cuidadosamente la muestra (450 μ L) que va a ser analizada sobre este cojín de sacarosa; luego se trabajó durante una hora a 50,000 RPM a +4°C en un rotor Beckman TL100. Después de centrifugar se drenó el tubo en tres partes. La fase superior (300 μ L) se denomina "el sobrenadante". La fase intermedia (300 μ L) es la fase de interfaz entre la muestra y el cojín de sacarosa, denominada aquí "la media". La fase inferior (300 μ L) es la solución de fondo, con la pella suspendida de nuevo cuando se ha efectuado la centrifugación sobre virus enteros; se denomina "la pella".

Se analizó adicionalmente las tres fracciones.

1.4.2.- Análisis de manchas Western

Este análisis permite que se compruebe la integridad del virus (fracción de pella positiva) y que se determine la eficacia de la división (adecuadamente, la fracción sobrenadante positiva para todas las proteínas estructurales, o la mayoría, como las proteínas de la envoltente).

Se usó anticuerpos específicos para la caracterización de proteínas virales específicas.

Para RSV-A se analizó las fracciones no dividida y dividida en cuanto al contenido de proteína anti-F (proteína de superficie); proteína anti-G (proteína de superficie), proteína anti-N (nucleocapsida) y proteína anti-M (matriz).

Para el virus PIV-3 se analizó las fracciones no dividida y dividida en cuanto a su contenido de proteína HN, con un anticuerpo monoclonal, y el contenido de proteínas F, M, HN, con un anticuerpo policlonal.

Para HSV se analizó las fracciones no dividida y dividida en cuanto a su proteína G, proteína de tegumento, y

proteína de capsida con anticuerpos.

CRITERIOS PARA LA DIVISIÓN

- 5 La presencia de una señal de mancha Western (WB) positiva contra las cuatro proteínas probadas en la fracción de pella, y la ausencia de señal en las otras dos fracciones, antes de la división, sugiere la presencia de virus enteros intactos en la preparación viral.
- 10 Se consideró efectiva la división cuando se rompió la envoltente y se detectó proteínas de envoltente en la fracción sobrenadante y/o media. Para RSV, la división fue efectiva cuando se detectó, por ejemplo, F o G en las fracciones S o M. De preferencia se localizó F y G sustancialmente en las capas S
- 15 y/o M, y no en la pella.

COMPENDIO DE LOS RESULTADOS

- Los resultados están mostrados en las figuras 1 a 4,
- 20 para RSVA.

En todos los resultados de mancha Western, "División-O" significa el virus antes de dividirlo. "S", "M" y "P" se refieren a las fracciones "sobrenadante", "media" y "pella", tomadas después de la ultracentrifugación de la muestra en un cojín de sacarosa,

25 respectivamente. La numeración de los carriles es de izquierda a derecha. Los volúmenes se refieren a la cantidad de muestra depositada sobre geles de SDS-PAGE.

La figura 1 ilustra una mancha Western de RSVA dividido, sondeado con mAb B4 (anti-F).

25
22

5

10

15

En el panel superior:			En el panel inferior:		
1	STD	10 µL	1	STD	10 µL
2	División O	10 µL	2	Regulador de muestra	10 µL
3	División O-S	10 µL	3	División O-S	10 µL
4	División O-M	10 µL	4	División O-M	10 µL
5	División O-P	10 µL	5	División O-P	10 µL
6	División DOC-S	10 µL	6	División planta-S	10 µL
7	División DOC-M	10 µL	7	División planta-M	10 µL
8	División DOC-P	10 µL	8	División planta P	10 µL
9	División sarco-S	10 µL	9	División laureth9-S	10 µL
10	División sarco-M	10 µL	10	División laureth9-M	10 µL
11	División sarco-P	10 µL	11	División laureth9-P	10 µL
			12	STD	10 µL

La figura 2 ilustra una mancha Western de TSVA dividido, sondeado con un anti-M monoclonal.

20

25

En el panel superior:			En el panel inferior:		
1	STD	10 µL	1	STD	10 µL
2	División O	20 µL	2	Regulador de muestra	20 µL
3	División O-S	20 µL	3	División O-S	20 µL
4	División O-M	20 µL	4	División O-M	20 µL
5	División O-P	20 µL	5	División O-P	20 µL
6	División DOC-S	20 µL	6	División planta-S	20 µL
7	División DOC-M	20 µL	7	División planta-M	20 µL

26
73

5

En el panel superior:			En el panel inferior:		
8	División DOC-P	20 µL	8	División planta-P	20 µL
9	División sarco-S	20 µL	9	División laureth9-S	20 µL
10	División sarco-M	20 µL	10	División laureth9-M	20 µL
11	División sarco-P	20 µL	11	División laureth9-P	20 µL

La figura 3 ilustra una mancha Western de RSVA dividido, sondeado con un anti-G monoclonal.

10

15

20

En el panel superior:			En el panel inferior:		
1	STD	10 µL	1	STD	10 µL
2	División O	20 µL	2	Regulador de muestra	20 µL
3	División O-S	20 µL	3	División O-S	20 µL
4	División O-M	20 µL	4	División O-M	20 µL
5	División O-P	20 µL	5	División O-P	20 µL
6	División DOC-S	20 µL	6	División planta-S	20 µL
7	División DOC-M	20 µL	7	División planta-M	20 µL
8	División DOC-P	20 µL	8	División planta-P	20 µL
9	División sarco-S	20 µL	9	División laureth9-S	20 µL
10	División sarco-M	20 µL	10	División laureth9-M	20 µL
11	División sarco-P	20 µL	11	División laureth9-P	20 µL

La figura 4 ilustra una mancha Western de RSVA dividido, sondeado con un anti-N-monoclonal.

27
24

5

10

En el panel superior:			En el panel inferior:		
1	STD	10 µL	1	STD	10 µL
2	División O	20 µL	2	Regulador de muestra	20 µL
3	División O-S	20 µL	3	División O-S	20 µL
4	División O-M	20 µL	4	División O-M	20 µL
5	División O-P	20 µL	5	División O-P	20 µL
6	División DOC-S	20 µL	6	División planta-S	20 µL
7	División DOC-M	20 µL	7	División planta-M	20 µL
8	División DOC-P	20 µL	8	División planta-P	20 µL
9	División sarco-S	20 µL	9	División laureth9-S	20 µL
10	División sarco-M	20 µL	10	División laureth9-M	20 µL
11	División sarco-P	20 µL	11	División laureth9-P	20 µL

15

20

25

La presencia de una señal en las fracciones media y sobrenadante, y difícilmente alguna banda en la fracción pella, después de la división para las proteínas F y G, muestra que la envoltente viral estaba completamente rota. La presencia de una señal en todas las fracciones, para las proteínas N y M, muestra la presencia de esas proteínas en las preparaciones divididas. Estos resultados sugieren que los cuatro detergentes probados conducen a virus RSVA dividido.

El análisis de las señales contra las cuatro proteínas, en todas las fracciones y, en particular, de las señales comparativas contra las proteínas N y M, después de la división en las fracciones media y sobrenadante, sugiere que, en la condición probada, NaDOC y Sarkosyl no solamente dan virus dividido, sino que también son capaces de romper todas las estructuras virales y de solubilizar las proteínas estructurales y no

estructurales.

Se obtuvo resultados similares con PIV, HSV y el virus del sarampión, que pueden ser divididos satisfactoriamente utilizando, por ejemplo, Nadoc al 2 por ciento o sarcosilo.

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

1.5.- Titulaciones virales *in vitro*

La pérdida de integridad después de la división hace no infecciosos a los virus. El análisis de la ruptura satisfactoria
10 del virus es demostrado por la pérdida de 10^6 log o más en el título viral, después de la división.

1.6.- Análisis de microscopía electrónica (ME)

Se llevó a cabo el análisis de microscopía electrónica usando un método de tinción negativa de dos pasos, estándar,
15 usando fosfotungstato de Na como agente de contraste (Hayat y Miller, 1990, *Negative Staining*, McGraw, ed. Hill). Se examinó las rejillas para determinar el patrón de división del material.

El análisis mediante microscopía electrónica de preparaciones virales de RSVA, HSV2 y PIV3 no divididos y
20 divididos con NaDoc y con Sarkosyl, apoya las observaciones hechas por medio de análisis de mancha Western. Para ilustrar los resultados están mostrados los datos de RSV, PIV y HSV

La figura 5 ilustra el material de partida RSV/A visualizado mediante ME. La figura 6 ilustra RSV/A después de
25 dividir con NaDOC. La figura 7 ilustra el material de partida PIV 3 visualizado mediante ME. La figura 8 ilustra PIV 3 después de dividir con NaDOC. La figura 9 ilustra el material de partida HSV2 visualizado mediante ME. La figura 10 ilustra HSV2 después de dividir con sarcosilo.

El virus no dividido (virus entero intacto) contenía partículas virales relativamente bien preservadas o ligeramente dañadas, y cierto material amorfo. Los virus divididos con NaDoc o con Sarkosyl mostraron la apariencia de un frotis heterogéneo de material amorfo, agregado en diversos grados. Se obtuvo datos similares con todos los virus probados, RSV, PIV y HSV. Adicionalmente se observó pocas estructuras identificables de la envoltura viral o de origen nucleoproteico, con RSV o PIV.

10

EJEMPLO 2

INMUNOGENICIDAD DE LAS VACUNAS DIVIDIDAS EN RATONES

Se usa preparaciones de RSV y/o PIV divididas como inmunógenos para vacunar ratones, para determinar la inmunogenicidad de esas preparaciones. Brevemente, se inmuniza ratones hembras de ocho semanas de edad, con preparaciones intranasales de vacuna dividida. Se incluye un control sin adyuvante. Se administra dos dosis a un intervalo de varias semanas.

20

Dos semanas después de la dosis final se sacrifican los animales y se recoge la sangre, células de bazo y/o lavados nasales. Se determina la respuesta inmunológica humoral, específica para el virus, en el suero; probando el suero del ratón en análisis ELISA específicos para el virus. Adicionalmente se determina el perfil de isotipo de la respuesta al anticuerpo, usando análisis específicos para el isotipo. Se determina la presencia de anticuerpos neutralizantes en el suero, usando un análisis de neutralización del virus específico. Se puede determinar la inducción de una respuesta inmunológica local

25

relevante mediante análisis de los anticuerpos en los lavados nasales, o alternativamente, mediante análisis de IgA específico para el virus, en los lavados nasales.

Se determina la inducción de respuestas inmunológicas celulares, específicas para el virus, mediante estimulación *in vitro* de células de bazo cosechadas y mediante medición de la proliferación celular (absorción de timidina tritlada) y/o secreción de IL-5 y de IFN γ por las células estimuladas.

Se determina el impacto de las variables en el experimento poniendo atención específica a la calidad y la magnitud de la respuesta inducida por las formulaciones divididas.

2.1.- Formulaciones de RSV dividido

La siguiente serie de experimentos ejemplifica que los virus divididos, tales como RSV, inducen una respuesta inmunológica potente, cuando son administrados por la ruta intranasal (IN). A fin de reflejar de manera más precisa el estado inmunológico de una población pediátrica (no sensibilizada) o de mayor edad (sensibilizada), se evaluó la inmunogenicidad en animales sensibilizados o no sensibilizados, y se demostró la inmunogenicidad en ambas poblaciones. Se usó el suministro IM para comparación.

En la primera serie de experimentos se usó ratones Balb/c hembras, de ocho semanas de edad, para probar la inmunogenicidad de la preparación de RSV dividido, administrada por ruta IM o bien por ruta IN. Se logró la sensibilización administrando 3×10^5 unidades formadoras de placa (pfu) de virus RSV vivo, administradas intranasalmente en un volumen de 60 μ L (2 x 30 μ L). Tres semanas después de la sensibilización se vacunó los animales con antígeno dividido de RSV. Se basó la

cuantificación del producto dividido de RSV en un ELISA específico para la proteína F de RSV, que cuantifica la proteína F presente en el producto dividido, en comparación con una norma de proteína PG recombinante. Se inmunizó ratones del grupo A con dos dosis de antígeno dividido de RSV, que contenía 4.2 µg de proteína F en 100 µL, administradas por ruta intramuscular, a un intervalo de 21 días. Se inmunizó los ratones del grupo C con una primera dosis de antígeno dividido de RSV que contenía 2.7 µg de proteína F en 60 µL y se administró una segunda dosis 21 días después del antígeno dividido de RSV que contenían 4 µg de proteína F, en 60 µL, por ruta intranasal. Dos semanas después de la última dosis, se sacrificó todos los animales y se evaluó la respuesta inmunológica.

Los resultados del experimento están resumidos en las figuras 11-16. Las primeras lecturas inmunológicas usadas para evaluar la respuesta inmunológica, fueron análisis ELISA que miden la inmunoglobulina (Ig) total específica para RSV FG, o bien los isotipos de IgG específicos para FG (IgG₁ e IgG_{2A}) que están presentes en los sueros de los animales vacunados. En estos análisis se reviste placas de 96 concavidades con antígeno RSV FG recombinante, y se diluye seriadamente los sueros de los animales, y se los aplica a las concavidades revestidas. Se detecta el anticuerpo unido, mediante la adición de un Ig, IgG₁ o IgG_{2A} de anti-ratón, biotinilado, seguido por una amplificación con estreptavidina conjugada con peroxidasa. Se revela el anticuerpo unido por adición de substrato OPDA, seguido por tratamiento con H₂SO₄ 2N, y por medición de la densidad óptica (DO) a 490 nm. Se calcula el título de anticuerpo a partir de una referencia, usando el programa de aplicación SoftMax Pro (usando una

ecuación de cuatro parámetros) y se expresa en UE/mL.

Además de los análisis ELISA, se incluyó los análisis de neutralización para caracterizar adicionalmente la calidad de la respuesta inmunológica inducida por la inmunización. Para el análisis de neutralización se incubó diluciones al doble de sueros de animal, con virus RSV/A (300 pfu) y complemento de conejillos de Indias durante una hora, a 37°C, en placas de cultivo de tejido, de 96 concavidades. Se añadió directamente células Hep-2 (10⁴ células/ concavidad) a cada concavidad, y se incubó las placas durante cuatro días a 37°C. Se aspiró los sobrenadantes y se añadió a cada concavidad solución WST-1, obtenible en el comercio. Se incubó las placas durante otras 18 a 24 horas a 37°C. Se vigiló la DO a 450 nm y se analizó la titulación por medio de análisis de regresión lineal. El título informado es la inversa de la dilución en suero, que dio por resultado el 50 por ciento de reducción de la DO máxima observada para las células sin infectar.

La figura 11 muestra los resultados obtenidos usando la lectura de ELISA para Ig total. En ratones sensibilizados se indujo una respuesta potente de anticuerpo anti-PG por medio de dos vacunaciones con antígeno de RSV dividido, administrado IM (grupos A, B) o IN (grupo C).

Específicamente, la figura 11 muestra los títulos (ELISA) de anticuerpo anti-PG (después de la vacunación secundaria) en ratones sensibilizados con RSV vivo e inmunizados con RSV dividido, por medio de las rutas intramuscular (IM) o intranasal (IN). El grupo A recibió dos dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido, IM. El grupo B recibió dos dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido, con adyuvante de aluminio, IM. El grupo C

recibió dos dosis de 2.7 y 4.0 µg, respectivamente, de RSV dividido, IN.

La figura 12 muestra los resultados del análisis de neutralización. Se indujo una respuesta potente de anticuerpo neutralizador de virus en estos animales sensibilizados, ya sea
5 mediante vacuna IM o mediante vacuna IN, con dos dosis del producto RSV dividido.

Específicamente, la figura 12 muestra los títulos de anticuerpo neutralizador anti-RSV/A (después de la vacunación
10 secundaria) en ratones sensibilizados con RSV vivo e inmunizados con RSV dividido, por las rutas intramuscular (IM) o intranasal (IN). El grupo A recibió dos dosis de 4.2 µg cada una, de RSV dividido, IM. El grupo B recibió dos dosis de 4.2 µg cada una, de RSV dividido, con adyuvante de aluminio, IM. El grupo C recibió
15 dos dosis de 2.7 y 4.0 µg, respectivamente, de RSV dividido, IN.

La figura 13 muestra los resultados del análisis de isótopo. En animales sensibilizados por vía intranasal, se incrementó la razón de IgG_{2A}:IgG₁, en comparación con los datos generados en ratones no sensibilizados (véase más adelante), lo
20 que sugiere una tendencia a una respuesta más parecida a Th1, cuando los ratones son sensibilizados con virus vivo (es decir, un situación natural en las poblaciones de edad avanzada).

Específicamente, la figura 13 muestra respuestas de isotipo de IgG anti-FG (ELISA) (después de la vacunación
25 secundaria) en ratones sensibilizados con RSV vivo, e inmunizados con RSV dividido por ruta intramuscular (IM) o intranasal (IN). El grupo A recibió dos dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido, IM. El grupo B recibió dos dosis de 4.2 µg cada una, de RSV dividido, con adyuvante de aluminio, IM. El grupo C

recibió dos dosis de 2.7 y 4.0 µg, respectivamente, de RSV dividido, IN.

La figura 14 demuestra que incluso después de una sola dosis de antígeno se genera una fuerte respuesta inmunológica, en respuesta a una vacunación IN con RSV dividido, en poblaciones sensibilizadas. Así, en poblaciones sensibilizadas, el RSV dividido es un inmunógeno potente, que induce elevados títulos de respuestas de anticuerpo, después de vacunación IN.

10 Específicamente, la figura 14 muestra títulos de anticuerpo anti-FG (ELISA) (después de vacunación primaria) en ratones sensibilizados con RSV vivo, e inmunizados con RSV dividido, por rutas intramuscular (IM) o intranasal (IN). El grupo A recibió dos dosis de 4.2 µg cada una de RSV dividido, por la ruta
15 IM. El grupo B recibió dos dosis de 4.2 µg cada una, de RSV dividido, con adyuvante de aluminio, por la ruta IM. El grupo C. recibió dos dosis de 2.7 y 4.0 µg, respectivamente, de RSV, por la ruta IN. El grupo D fue sensibilizado únicamente y no recibió vacunación. Los títulos de anticuerpo informados para este grupo
20 están por debajo del nivel de detección y fueron medidos a los 21 días después de la sensibilización.

En la segunda serie de experimentos se usó ratones no sensibilizados para documentar el efecto de la dosis de antígeno y de adyuvante sobre la inmunogenicidad del producto de RSV
25 dividido. Los ratones recibieron antígeno de RSV dividido que contenía 2.4 µg de proteína F (suministrada en 60 µL – 2 X 30 µL) para la primera dosis. Para la segunda dosis, suministrada 30 días después, los ratones recibieron el antígeno de RSV dividido que contenía 3.5 µg de proteína F. El RSV dividido, por la ruta

IN, fue administrado sin adyuvante o con adyuvante, mediante la adición de 5 µg de toxina lábil (TL) de *E. coli* o con 0.5% de éter 9-laurílico de polioxietileno (denominado aquí "Laureth 9"). Se inmunizó por vía intranasal un grupo de control, con virus RSV
5 purificado, entero, que contenía 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 sacrificó los animales y se evaluó la respuesta inmunológica.

Como se muestra en las figuras 15 y 16, se indujo
10 respuestas de anticuerpo mediante las formulaciones IN en ratones no sensibilizados. Si bien las lecturas de ELISA (figura 15) sugieren que las respuestas a la vacunación por la vía IN son inferiores a las inducidas por la vía IM, la lectura de neutralización (figura 16) sugiere que la formulación de RSV
15 dividido con adyuvante LT, administrada por la ruta IN, es por lo menos tan buena como por la ruta IM para inducir anticuerpos neutralizadores, y que las demás formulaciones también son comparables con la ruta IM. Así pues, en ratones no sensibilizados, el RSV dividido, administrado por la ruta IN
20 también es inmunogénico.

Específicamente, la figura 15 muestra los títulos de anticuerpo anti-FG (ELISA) (después de la vacunación secundaria) en ratones no sensibilizados, inmunizados con RSV dividido, por ruta intranasal (IN) o intramuscular (IM). El grupo A recibió dos
25 dosis de 2.4 y 3.5 microgramos cada una, de RSV dividido, por la ruta IN. El grupo B recibió dos dosis de 2.4 y 3.5 microgramos cada una, de RSV dividido con adyuvante Laureth 9, por la ruta IN. El grupo C recibió dos dosis de 2.4 y 3.5 microgramos cada una de RSV dividido, con adyuvante LT, por la ruta IN. El grupo D

recibió dos dosis de 2.0 y 3.5 microgramos cada una, de virus entero purificado, por la ruta IN. El grupo E recibió dos dosis de 4.2 µg cada una, de RSV dividido, por la ruta IM.

La figura 16 muestra títulos de anticuerpo neutralizante anti-RSV/A (después de vacunación secundaria) en ratones no sensibilizados, inmunizados con RSV dividido, por la ruta intranasal (IN) o Intramuscular (IM). El grupo A recibió dos dosis de 2.4 y 3.5 µg cada una, de RSV dividido, por la ruta IN. El grupo B recibió dos dosis de 2.4 y 3.5 µg cada una, de RSV dividido, con adyuvante Laureth 9, por la ruta IN. El grupo C recibió dos dosis de 2.4 y 3.5 microgramos cada una, de RSV dividido, con adyuvante LT, por la ruta IN. El grupo D recibió dos dosis de 2.0 y 3.5 microgramos cada una, de virus entero purificado, por la ruta IN. El grupo E recibió dos dosis de 4.2 microgramos cada una, de RSV dividido, por la ruta IM.

En resumen, estos experimentos han demostrado que el antígeno RSV dividido es fuertemente inmunogénico tanto en poblaciones sin sensibilizar como en poblaciones sensibilizadas. Adicionalmente, estos experimentos han demostrado que se puede administrar el RSV dividido, en forma efectiva, por la ruta intranasal, y que es inmunogénico.

REIVINDICACIONES

1.- El uso de una preparación de virus con envoltente,
5 dividido, que no es una preparación de virus de *Influenza* dividido,
en la fabricación de una formulación de vacuna, para suministro
intranasal.

2. El uso de conformidad con la reivindicación 1,
caracterizado además porque la preparación de virus con
10 envoltente, dividido, es de un solo virus, o es una mezcla de virus
sincicial respiratorio, virus de parainfluenza, virus de sarampión y
virus de *herpes simplex*.

3.- El uso de conformidad con la reivindicación 1 o la
reivindicación 2, caracterizado además porque la preparación de
15 virus con envoltente, dividido, comprende fragmentos de
membrana viral, proteínas de envoltente de membrana viral,
matriz viral y nucleoproteínas.

4.- El uso de conformidad con cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 3, caracterizado además porque comprende
20 adicionalmente uno o más agentes de división residuales.

5.- El uso de conformidad con la reivindicación 4,
caracterizado además porque el agente de división residual está
seleccionado del grupo que consiste de: laureth 9, NaDOC, grupo
sarcosilo, Tween 80™ y Triton X100™.

25 6.- El uso de conformidad con la reivindicación 5,
caracterizado además porque el agente de división es NaDOC o
sarcosilo.

7.- El uso de conformidad con cualquiera de las
reivindi-caciones 1 a 6, caracterizado además porque comprende

adicionalmente un agente estabilizador.

8.- El uso de conformidad con la reivindicación 7, caracterizado además porque el agente estabilizador es un agente tensioactivo.

5 9.- El uso de conformidad con la reivindicación 8, caracterizado además porque el agente tensioactivo es uno de los siguientes o una mezcla de los siguientes: monooleato de polioxietilen-sorbitán (TWEEN 80™), ter-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X100™) y éter 9 laurílico de polioxietileno.

10 10.- El uso de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado además porque comprende adicionalmente un adyuvante.

11.- Un método para producir una formulación de vacuna intranasal, que no es una preparación de virus de
15 *influenza* dividido, como se reivindicó en cualquiera de las reivindicaciones precedentes, caracterizado dicho método porque comprende los pasos de:

- (a) dividir un virus con envoltente; y
- (b) opcionalmente mezclar la preparación de virus con
20 envoltente, dividido, con un agente estabilizador; y
- (c) mezclar opcionalmente la preparación de virus con envoltente, dividido, con un adyuvante (portador y/o inmunoestimulante).

12.- Un método para producir una formulación de
25 vacuna de conformidad con la reivindicación 11, caracterizado además porque el agente estabilizador es por lo menos un agente tensioactivo seleccionado del grupo que comprende: monooleato de polioxietilen-sorbitán (TWEEN 80™), ter-octilfenoxipolietoxietanol (TRITON X100™) y éter 9-laurílico de

polioxielileno.

13.- El uso de una preparación de vacuna de virus con
envolvente, dividido, que no es una preparación de virus de
influenza, en la fabricación de una formulación de vacuna
5 intranasal, para la profilaxis y el tratamiento de enfermedades.

14.- Un estuche para suministrar una formulación de
vacuna intranasal, como la reivindicada en cualquiera de las
reivindicaciones 1 a 10, caracterizado el estuche porque
comprende:

- 10 (a) una preparación de virus con envolvente, dividido; y
(b) un dispositivo para el suministro intranasal.

15.- Un dispositivo para suministro intranasal,
caracterizado porque comprende una vacuna de conformidad con
cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10.

15 16.- Un dispositivo de conformidad con la
reivindicación 15, caracterizado porque es un dispositivo con
umbral de presión.

17.- Un método para proteger o tratar un mamífero
susceptible a, o que sufre de, una enfermedad provocada por un
20 virus con envolvente, caracterizado dicho método porque
comprende administrar, por medio de una ruta nasal, una vacuna
de acuerdo con las reivindicaciones 1 a 10.

18.- Un método, el uso, un estuche o un dispositivo de
conformidad con cualquiera de las reivindicaciones precedentes,
25 caracterizado además porque la formulación de vacuna es
Inmunogénica en individuos seropositivos y seronegativos.

Fig. 1

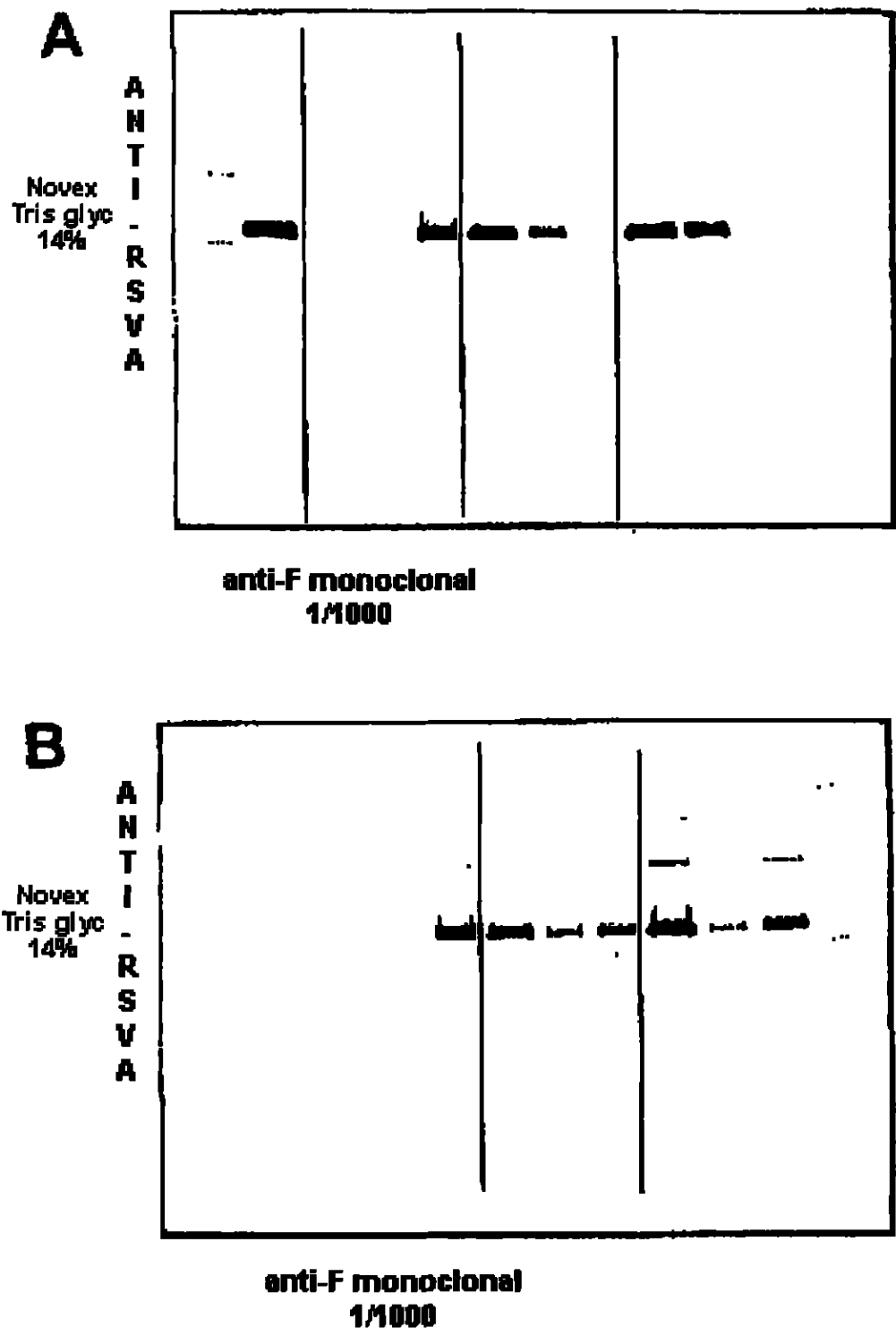


Fig. 2

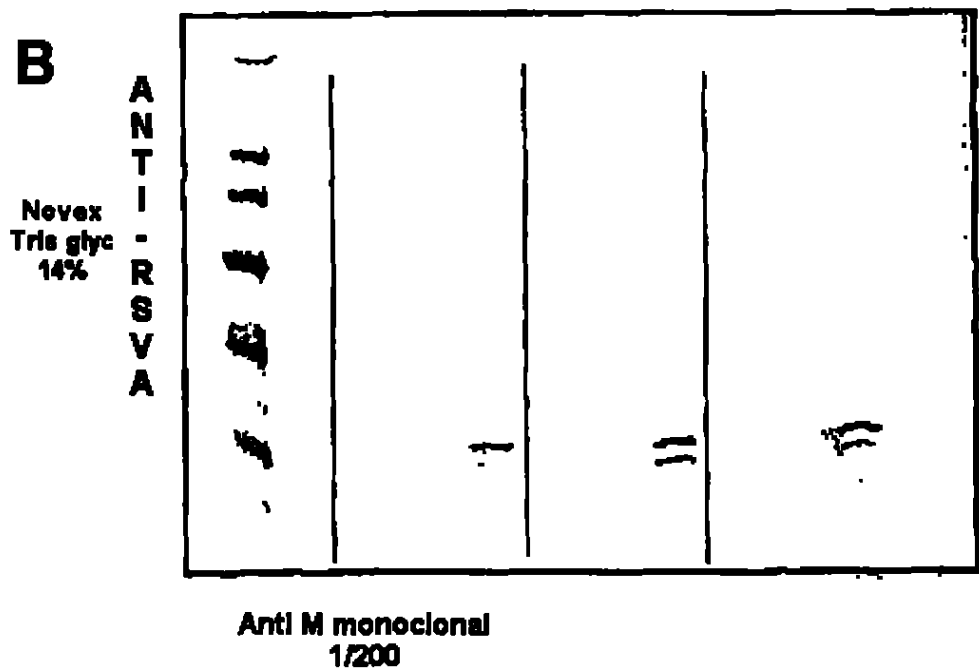
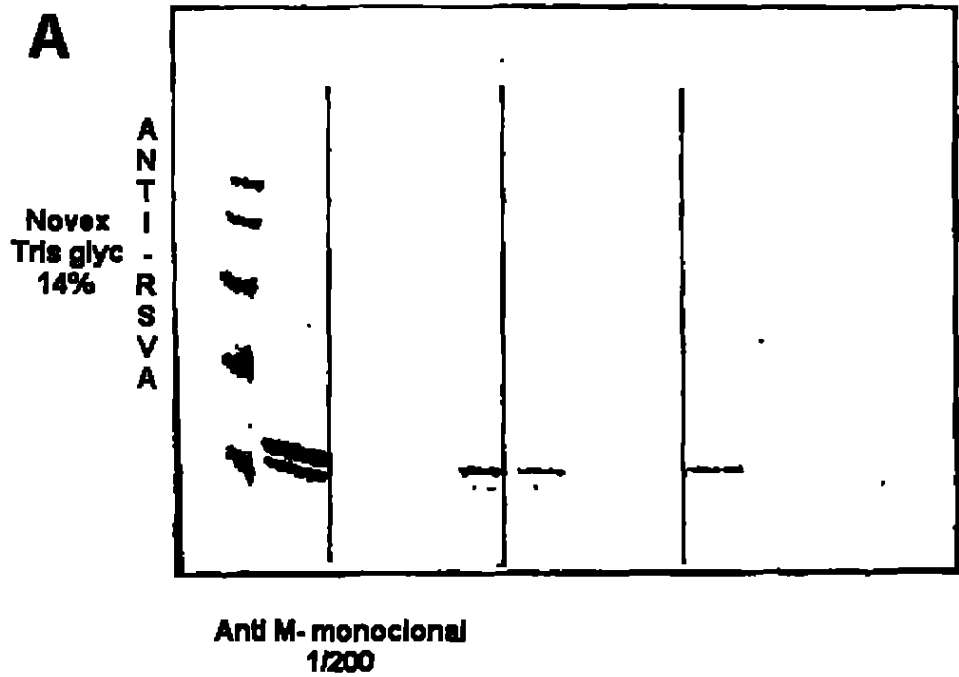


Fig.3

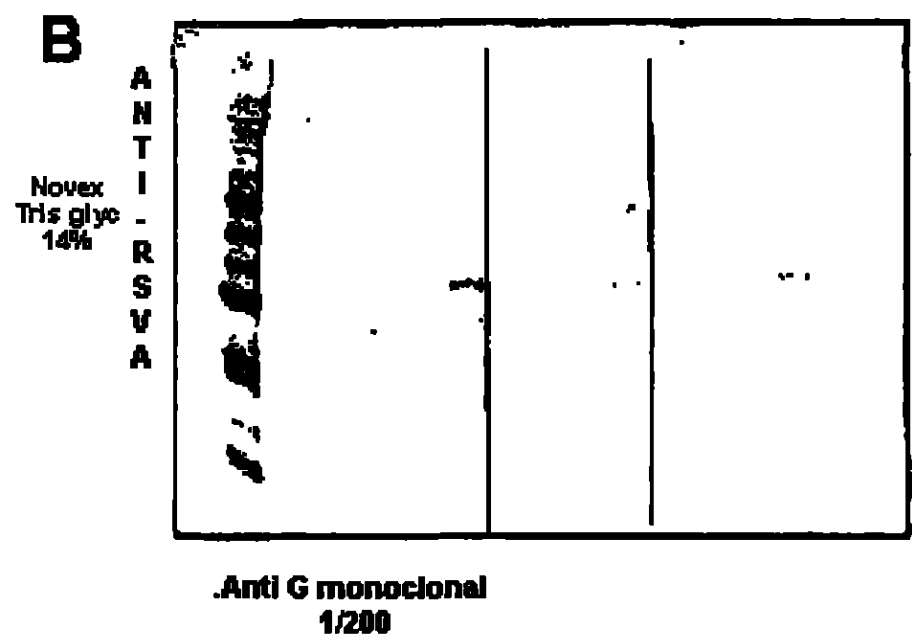
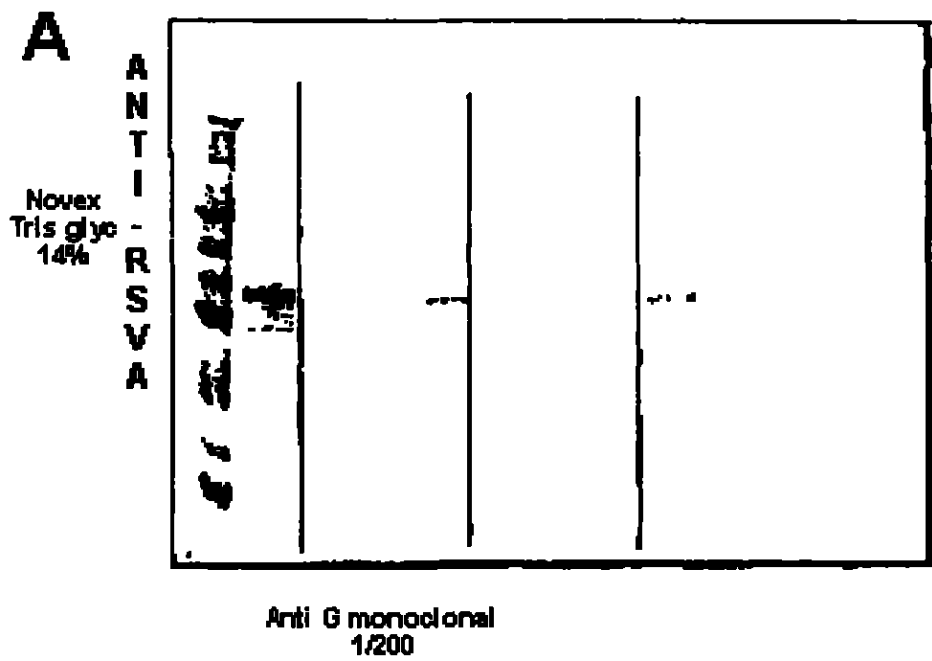


Fig. 4

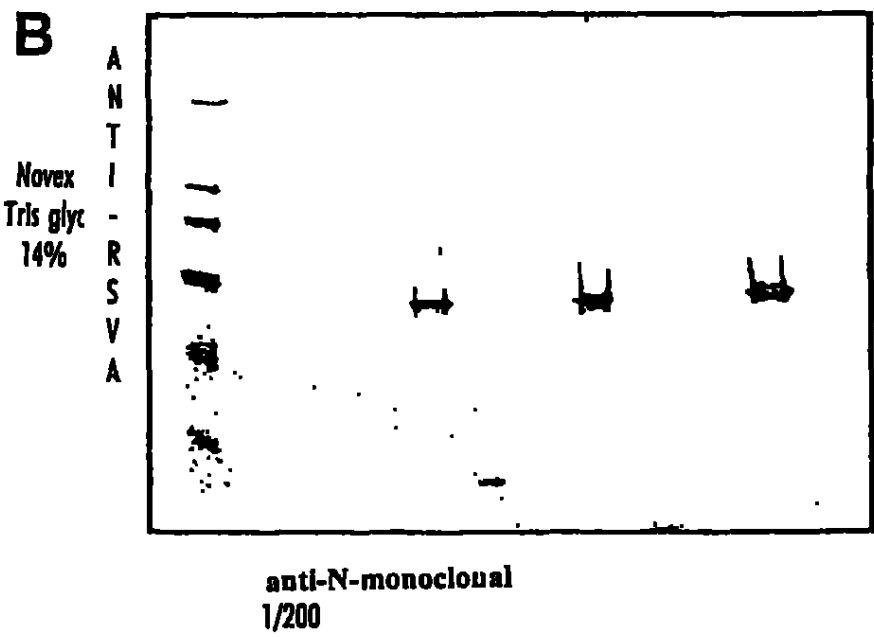
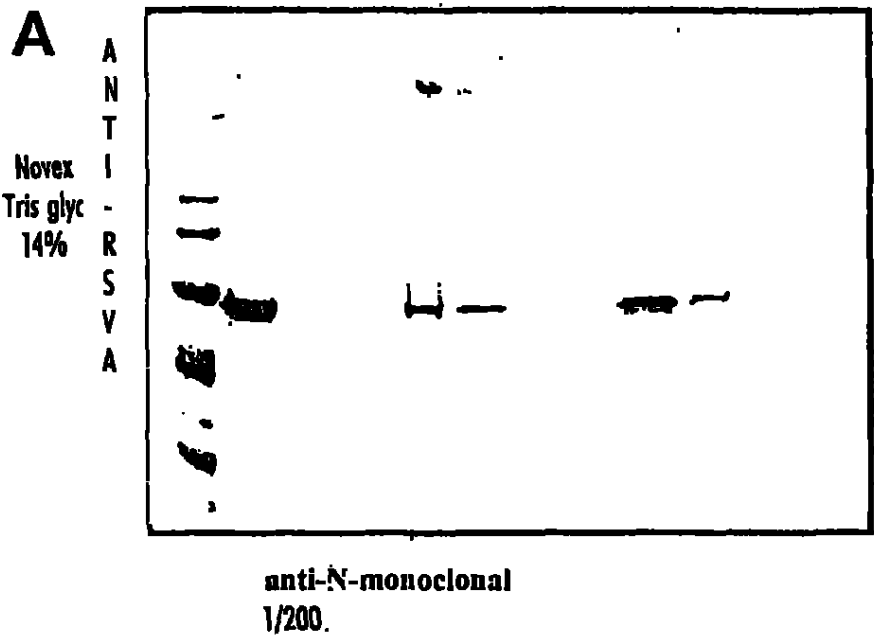


Fig. 5

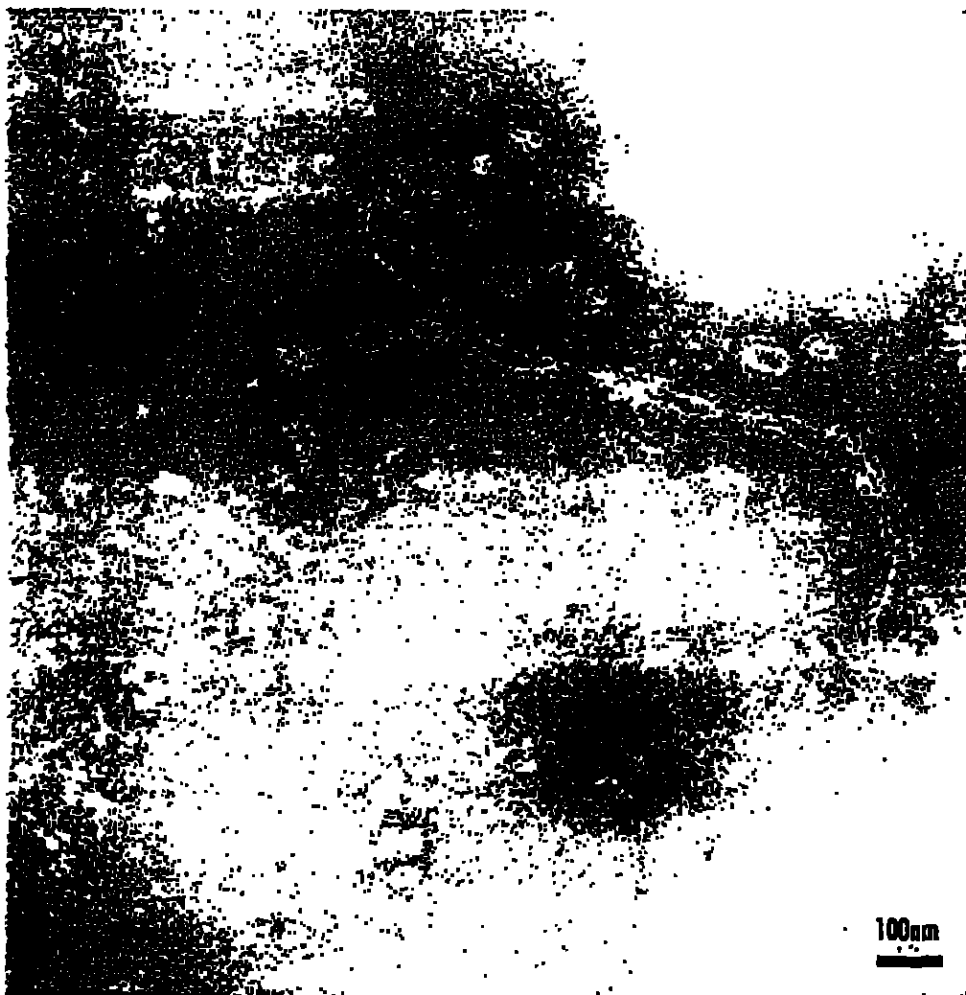


Fig. 6



Fig. 7

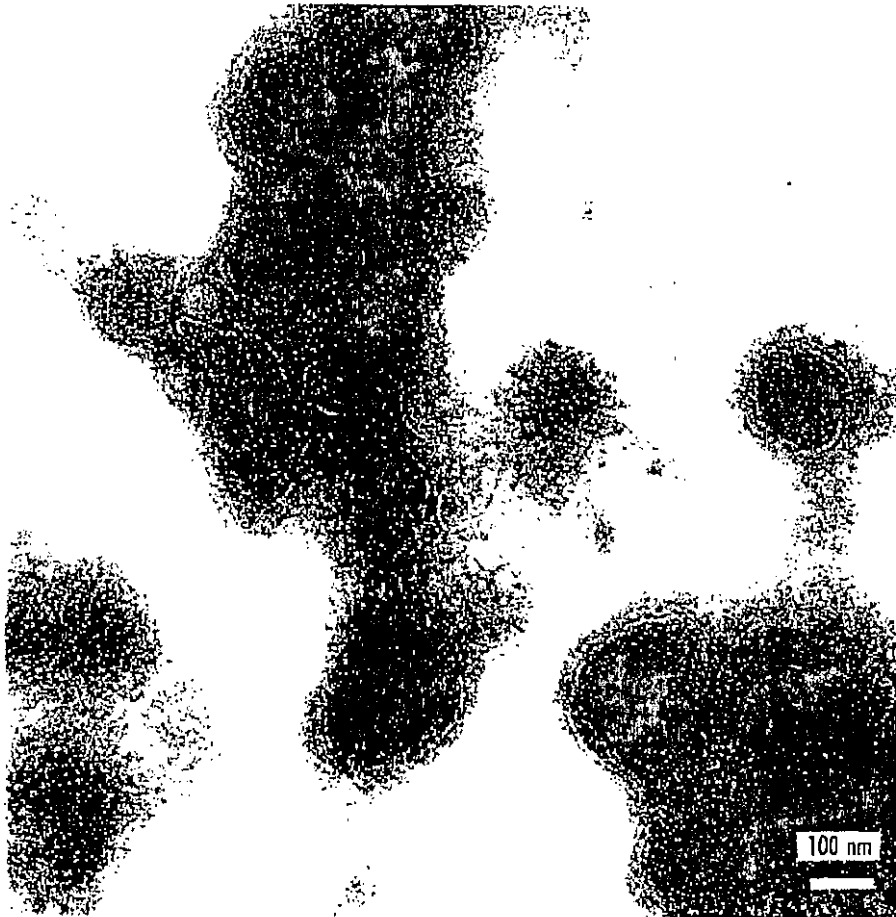


Fig. 8



9/16/8

98
95

Fig. 9

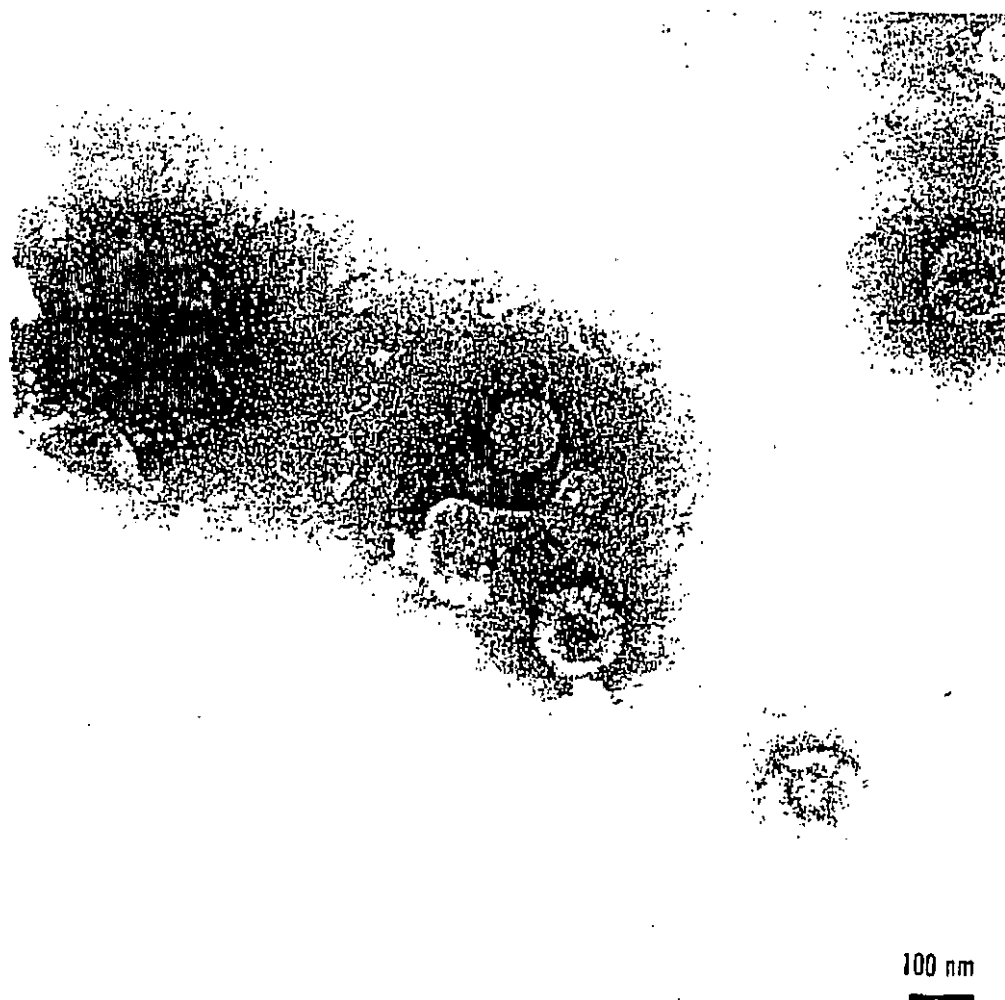


Fig. 10

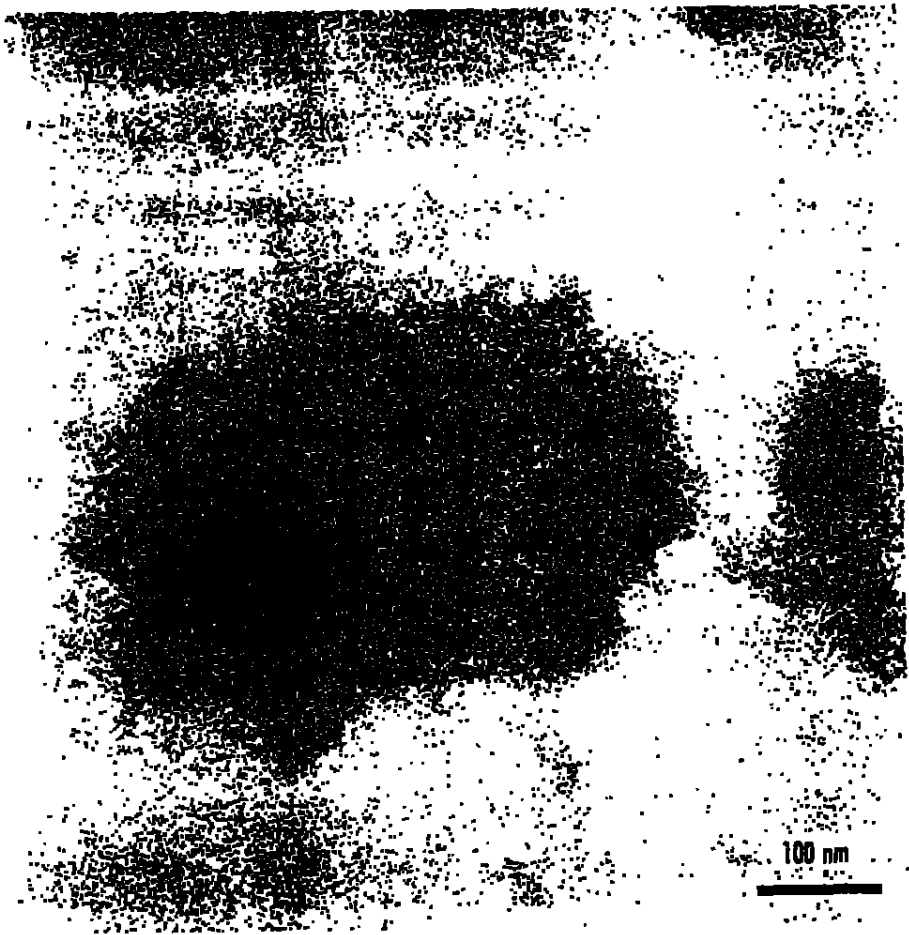


Fig. 11

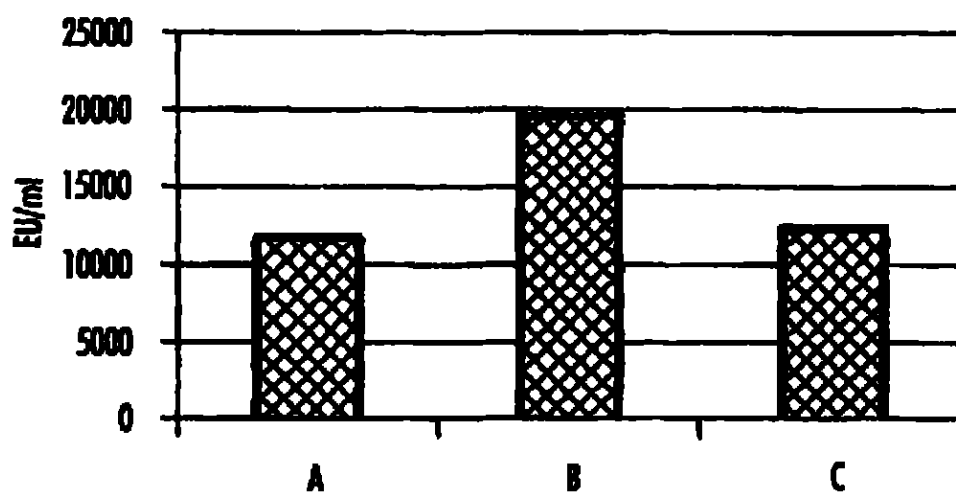
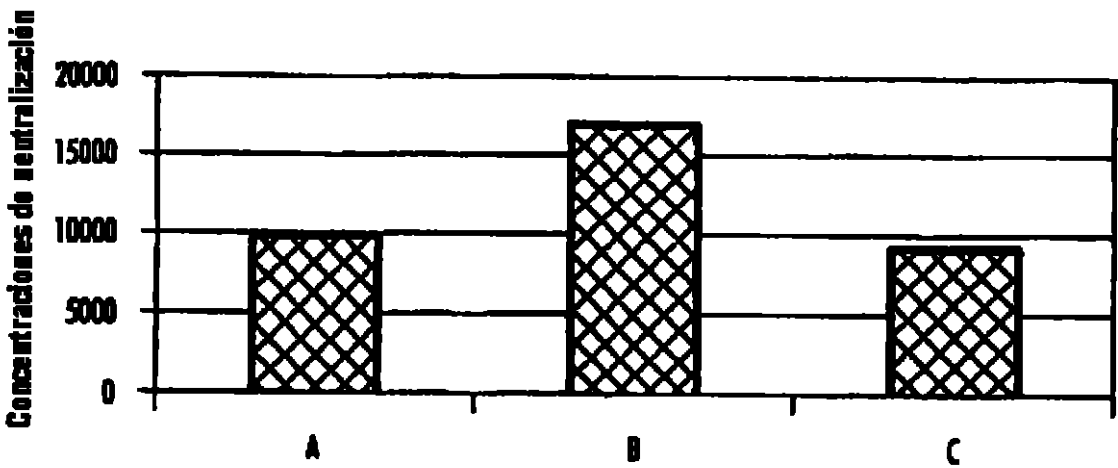


Fig. 12



102
99

13/16

Fig. 13

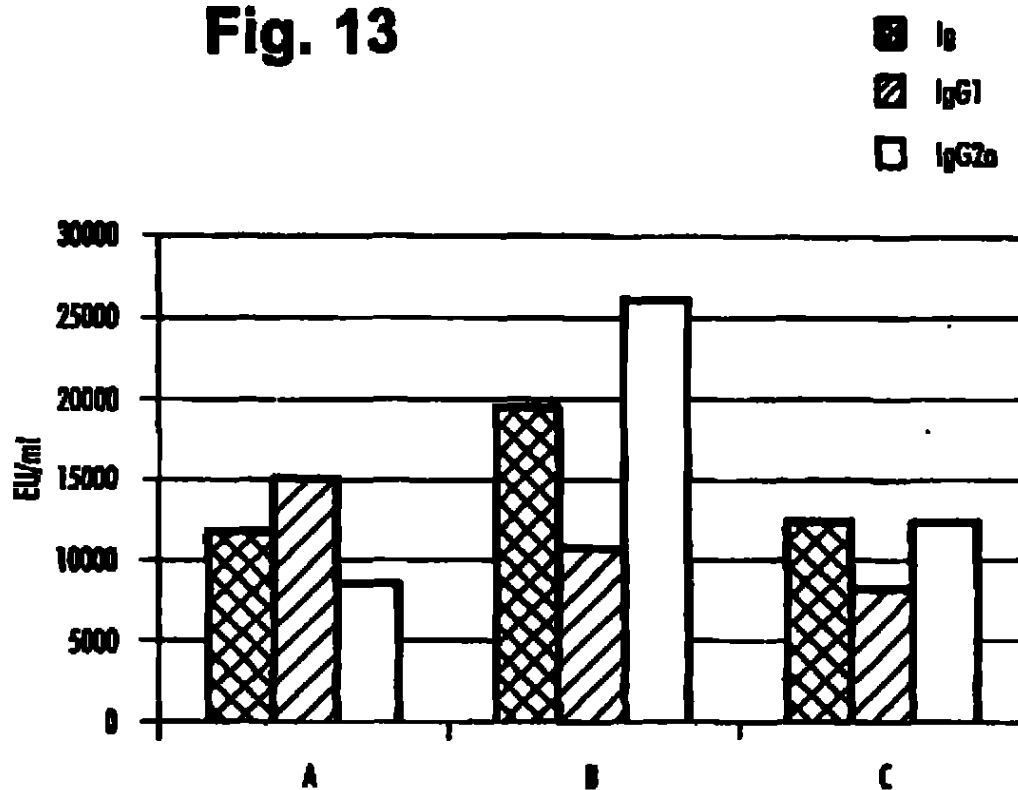


Fig. 14

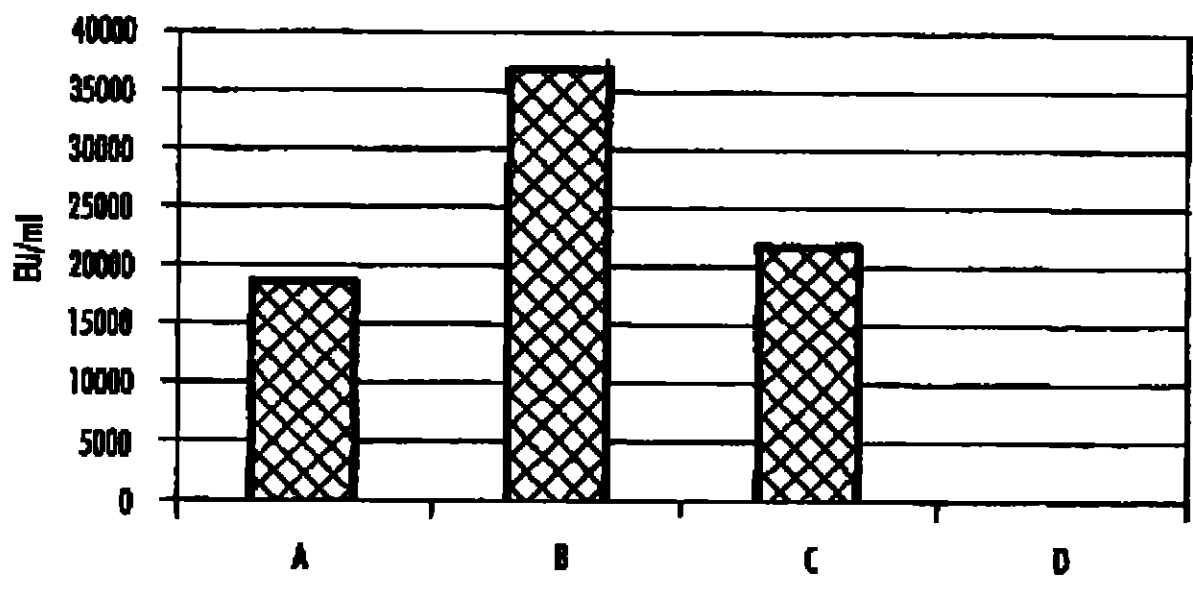


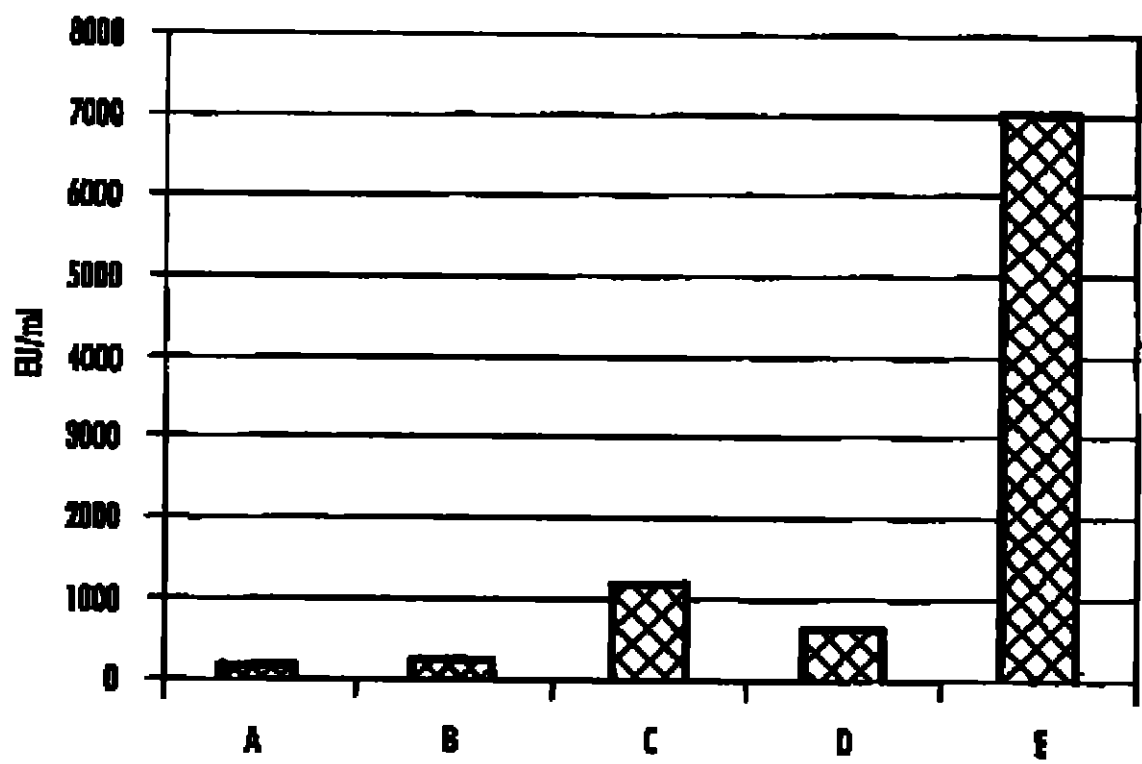
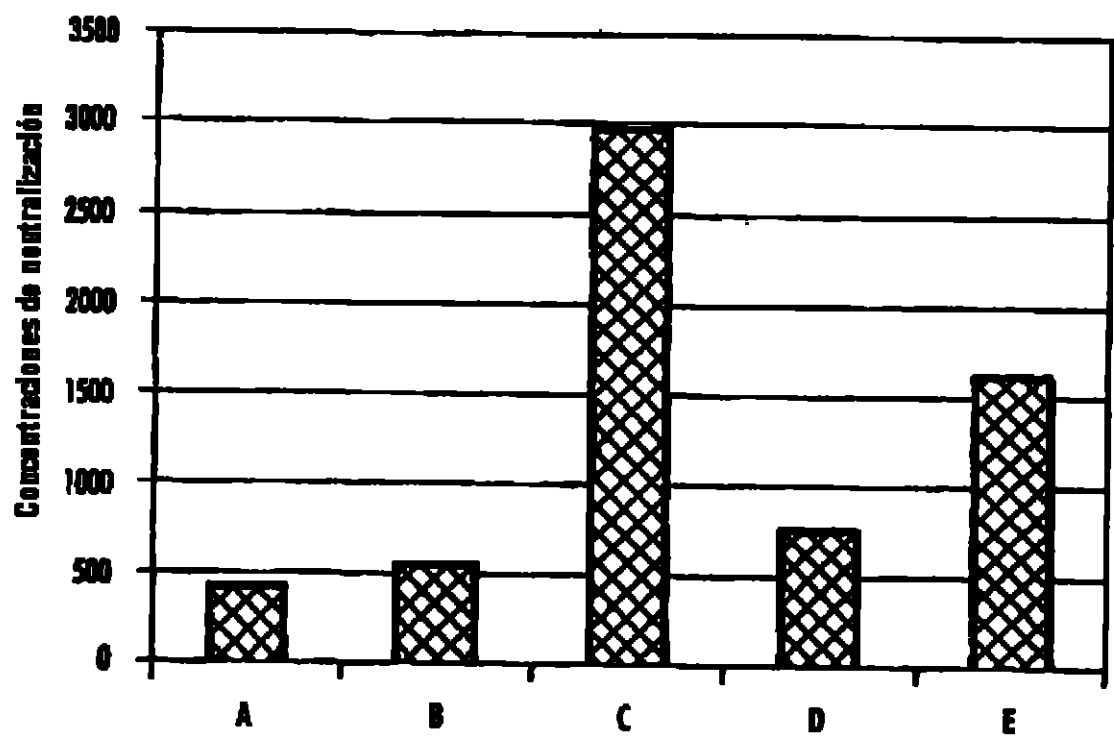
Fig. 15

Fig. 16

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10
Conmutador: 3 82 08 40
Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia



2020
Bogotá, D.C.,

107
104


Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Doctor:
José Antonio Lloreda
Apoderado
Glaxo Smithkline Biologicals S.A.

Oficio N°

09512

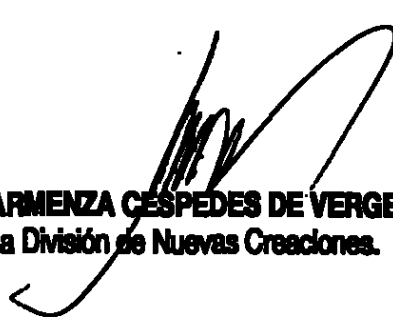
ASUNTO:	Radicación N°	03-27703
	Solicitud internacional	PCT/EP2001/11326
	Fecha inicio fase nacional	02/05/2003
	Trámite	011
	Evento	379
	Actuación	430
	Folios	001

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 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. 28-k) Decisión 486).
- ☐ La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsecuentes 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 _____.