

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-277999- -00000-0000

Fecha: 2013-11-26 16:49:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Industria y Comercio

SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. _____

54. TÍTULO **“VACUNA DE VIRUS DE DENGUE
INACTIVADO”**

51. CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL **A61K 39/12**

71. SOLICITANTE **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**

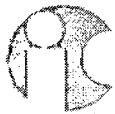
DOMICILIO **RIXENSART, BÉLGICA.**

74. REPRESENTANTE LEGAL **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
T.P. 53.215

26 NOV 2013
22. BOGOTÁ, D.C. _____

(FORMA P 10)

C 1

 Industria y Comercio SUPERINTENDENCIA	SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO  No. 13-277999- -00000-0000 Fecha: 2013-11-26 16:49:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI Act. 411 PRESENTACION Folios: 4
---	--

DIRECCIÓN DE NUEVAS CREACIONES
SOLICITUD FASE NACIONAL –PCT

1	(12) TIPO DE SOLICITUD	☒ Patente de invención ☒ Capítulo I	☐ Patente de Modelo de Utilidad ☐ Capítulo II
2	DATOS SOLICITUD INTERNACIONAL PCT (86)		
Solicitud Internacional No.		PCT/EP2012/059879	Fecha 25/05/12
Publicación Internacional No.		WO 2012/160199 A1	Fecha 29/11/12
3	(54) TÍTULO DE LA INVENCION:		
"VACUNA DE VIRUS DE DENGUE INACTIVADO"			
4	CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL (51) CIP		
A61K 39/12			
5	(71) SOLICITANTE (S) ☐ Esta persona también es inventor. Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS O RAZÓN SOCIAL		NOMBRE	IDENTIFICACIÓN TIPO
4. GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.			
6	DATOS DEL SOLICITANTE		
DIRECCIÓN Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica		No. TELÉFONO	3264270
CIUDAD Rixensart		E-MAIL	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
DEPARTAMENTO/ESTADO		NACIONALIDAD O LUGAR DE CONSTITUCIÓN	Bélgica
PAÍS DE RESIDENCIA Bélgica			
7	(72) INVENTOR (ES) Para datos adicionales utilizar hoja de información complementaria		
APELLIDOS		NOMBRES	NACIONALIDAD
1. HENDERICKX 2. LE BUSSY 3. LEMOINE 4. MATHOT		Veronique Olivier Dominique, Ingrid Frederic	Bélgica
DIRECCIÓN DE CORREO ELECTRÓNICO: notificacionespatentes@lloredacamacho.com			
8	DATOS INVENTOR (ES)		
PAÍS RESIDENCIA	DEPARTAMENTO/ ESTADO	CIUDAD	DIRECCIÓN
Bélgica		Rixensart	Glaxosmithkline Biologicals SA, rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica.
OTRO(S) SOLICITANTE(S) Y/O (OTRO(S)) INVENTOR(ES)			
☐ Los demás solicitantes y/o (demás) inventores se indican en una hoja a continuación.			
9	(74) ☒ REPRESENTANTE ☒ APODERADO		
APELLIDOS		NOMBRES	IDENTIFICACIÓN
LLOREDA RICAURTE		ALICIA	C.C 39.690.713 T.P. 53.215
DIRECCIÓN Calle 72 No 5-83 Piso 5to		No. TELÉFONO	3264270
CIUDAD Bogotá		E-MAIL	notificacionespatentes@lloredacamacho.com
PAÍS Colombia		No. DE PROTOCOLO EN LA OFICINA	

10	(30) DECLARACIONES DE PRIORIDAD ☒ SI ☐ NO			
(33) PAÍS DE ORIGEN		CÓDIGO PAÍS	(31) NÚMERO	(32) FECHA (AAAA/MM/DD)
1. Estados Unidos de América		US	61/490,205	11/05/26
2. Estados Unidos de América		US	61/570,966	11/12/15
11	DECLARACIÓN SOBRE USO DE RECURSOS GENÉTICOS O BIOLÓGICOS			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de recursos genéticos o biológicos de los que cualquiera de los países miembros de la Comunidad Andina es país de origen.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, o certificado o número de registro, expedido por la Autoridad competente.				
12	DECLARACIÓN SOBRE USO DE CONOCIMIENTOS TRADICIONALES			
<i>Declaro que el objeto de la presente solicitud de patente fue obtenido a partir de conocimientos tradicionales de comunidades indígenas, afroamericanas o locales de países miembros de la Comunidad Andina.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso afirmativo deberá anexar la licencia o autorización de uso de conocimiento tradicional, o certificado, o número de registro expedido por la Autoridad competente.				
13	REDUCCIÓN DE TASAS			
<i>Declaro que carezco de medios económicos para presentar la solicitud de patente.</i>				
☐ SI ☒ NO				
Nota: En caso de ser persona natural y carecer de medios económicos, y por lo tanto, aplique la reducción de tasas a que se refiere la resolución vigente en tarifas, debe firmar la presente solicitud bajo la gravedad de juramento.				
Micro, pequeñas y medianas empresas		Universidades públicas o privadas	Entidades sin ánimo de lucro	
☐ Copia simple de la declaración de renta del año inmediatamente anterior, o en su defecto prueba documental idónea.		☐ Copia acto de reconocimiento institucional emitido por el Ministerio de Educación. Acreditación Colciencias.	☐ Copia de registro vigente en Cámara de comercio.	
☐ Documento de constancia de cumplimiento con lo establecido en la ley 905 de 2004.			☐ Hoja de información complementaria.	
			☐ Otros, especificar	
14	AUTORIZACIÓN DE NOTIFICACIÓN EN LÍNEA ☒ SI ☐ NO			
Manifiesto que he leído y entendido perfectamente los términos y condiciones de uso de medios electrónicos para las notificaciones en línea a través de Internet de los actos administrativos proferidos por la Superintendencia de Industria y Comercio que deben ser notificados personalmente y, en consecuencia, autorizo el servicio de notificación a través de Internet.				
14	COMPROBANTE DE PAGO O PAGO ELECTRÓNICO	N° 13-117413	Fecha 18-11-2013	
15	FIRMA DEL SOLICITANTE, DEL APODERADO O DEL REPRESENTANTE LEGAL			
<i>Junto a cada firma, indicar el nombre del firmante y su calidad (si tal calidad no es obvia al leer el petitorio)</i>				
 ALICIA LLOREDA RICAURTE Representante C.C. 39.690.713 T.P. 53.215 Apoderado				
16	ORDEN Y RELACIÓN DE DOCUMENTOS QUE ACOMPAÑAN LA SOLICITUD			
Documentación Técnica Solicitud Internacional en castellano		Documentación Jurídica		
1. ☒ Descripción N° de folios: 74		9. ☒ Poderes, si fuera el caso.		
2. ☒ Reivindicaciones N° Reivindicaciones: 119		10. ☐ Documento que legalmente pruebe la cesión del inventor al solicitante o a su causante.		
3. ☒ Dibujos y/o figuras N° folios: 14		11. ☐ Copia del contrato de acceso de recursos genéticos o productos derivados, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
4. ☒ Resumen.		12. ☐ Copia de la licencia o autorización de Conocimientos Tradicionales, certificado o número de registro, si fuera el caso.		
5. ☐ Certificado de depósito de material biológico si fuera el caso.		13. ☒ Documento que acredita la existencia y representación legal, cuando el solicitante es persona jurídica.		
6. ☐ Listado de secuencias de nucleótidos y/o aminoácidos en forma digital si fuera el caso.		14. ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.		
7. ☐ Arte final 12 x 12.		15. ☐ Comprobante de pago por reivindicación de prioridad.		
8. ☒ Anexo formato digital.		16. ☐ Comprobante de pago de la tasa por concepto de excedente de palabras en la publicación.		
		17. ☐ Comprobante de pago por reivindicación adicional a 10.		

VER ANEXO CD

		PLANILLA DE RADICACIÓN - DIGITALIZACIÓN DIARIA RELACIÓN DE ANEXOS	
Dependencia: 2020		Fecha: <u>13</u> / <u>11</u> / <u>26</u> AAAA MM DD	
		Recorrido: 3	
Tipo de Radicación: Entrada: ☒ Salida: ☐ Traslado: ☐ Convenio: ☐			
Radicador:		Planilla:	

ID	No. Radicación	Consecutivo	Item
1	13 - 277999-	0	7
2			
3			
4			
5			
6			
7			
8			
9			
10			
11			
12			
13			
14			
15			
16			
17			

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

Observaciones: EL CD ANEXO CONTIENE UN TOTAL DE 8 ARCHIVOS 8 EN FORMATO P.D.F, LOS CUALES FUERON PROCESADOS. UBICADO EN EL FOLIO 3.

CC

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800.176.089-2

- / -



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 13 - 117413

Bogotá D.C., Noviembre 18 de 2013 - 16:49:09

RECIBIDO DE : LLOREDA & CIA. S.A.

NI 830.022.145

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR. PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	590198696	18/11/2013	19.295.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE INVENCIÓN	500.000.00	500.000.00
				<u>\$500.000.00</u>
			=====	

SON: **QUINIENTOS MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No. 13-277999- -00000-0000

Fecha: 2013-11-26 16:49:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4

Sede Centro: Carrera 13 No. 27 - 00 Pisos 3,4,5 y 10 Bogotá, D.C.- Colombia

Web: www.sic.gov.co e-mal: info@sic.gov.co Conmutador: (571) 5870000 Fax: (571) 5870284 Línea: 018000-910165 Call Center: (571) 6513240

, Noviembre 18 de 2013 - 16:49:14



No. 13-277999- -00000-0000

Fecha: 2013-11-26 16:49:14 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 4



LISTA DE CHEQUEO
ADMISIÓN A TRÁMITE - NUEVAS CREACIONES

PATENTE DE INVENCION ☐

MODELO DE UTILIDAD ☐

Art 33 Decisión 486/00

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

PATENTE DE INVENCION PCT ☒

MODELO DE UTILIDAD PCT ☐

Art.33 Decisión 486/00, Circular Única

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

DISEÑO INDUSTRIAL ☐

(Art. 119 Decisión 486/00)

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

ESQUEMA DE TRAZADO ☐

(Art. 92 Decisión 486/00)

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

VACUNA DE VIRUS DE DENGUE INACTIVADO

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

5 La presente invención proporciona formulaciones de una composición
inmunogénica que contiene un virus de Dengue inactivado purificado, y un
método para su producción.

SECTOR: Inmunología. Composición inmunológica para prevención de la
10 infección por virus de dengue.

15

20

25

VACUNA DE VIRUS DE DENGUE INACTIVADO

REFERENCIA CRUZADA A SOLICITUDES RELACIONADAS

Esta solicitud reclama el beneficio de las fechas de presentación anteriores de las Solicitudes Provisionales de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Números 61/490,205, presentada el 26 de mayo de 2011, y 61/570,966, presentada el 15 de diciembre de 2011, las divulgaciones de las cuales se incorporan a la presente.

NOTIFICACIÓN DE DERECHOS DE AUTOR (COPYRIGHT) DE ACUERDO CON EL TÍTULO 37 DEL CÓDIGO DE REGLAMENTOS FEDERALES (CFR)

SECCIÓN 1.71(E)

Una porción de la descripción de este documento de patente contiene material que está sujeto a la protección de derechos de autor (copyright). El propietario de los derechos de autor (copyright) no tiene objeción alguna con respecto a la reproducción facsímil hecha por quien sea, del documento de patente o de la divulgación de la patente, como aparece en el expediente de la patente o en los registros de la Oficina de Patentes y Marcas, pero se reserva de otra manera todos los derechos de autor (copyright) que se presenten.

ANTECEDENTES

El Dengue es una enfermedad viral aguda del hombre, la cual es transmitida por los mosquitos. Es endémica en el trópico y en el subtrópico, en todo el mundo, en donde se presenta anualmente una estimación de 100,000,000 casos. Aunque es relativamente rara, la fiebre hemorrágica por

Dengue (DHF) y el síndrome de choque por Dengue (DSS) son causas significativas de muerte en los niños. En el presente, no existe ninguna vacuna para proteger contra el Dengue, y los intentos por prevenir la enfermedad mediante el control del vector del mosquito han probado ser en gran parte inefectivos. Por consiguiente, sigue existiendo una necesidad de una vacuna segura y efectiva para proteger contra la enfermedad causada por el virus de Dengue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LA INVENCION

La divulgación de la presente invención se refiere a la formulación de composiciones que provocan una respuesta inmunitaria contra el virus de Dengue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

La Figura 1 es una ilustración esquemática de la fórmula genérica de un
15 tensoactivo de poloxámero: copolímero de tres bloques (tribloque) de α -hidro- ω -hidroxi-poli-(oxietileno) poli-(oxipropileno) poli-(oxietileno).

Las Figuras 2A y 2B son diagramas de flujo que ilustran los procesos de
ejemplo para la purificación e inactivación de una composición inmunogénica, la
cual comprende el virus de Dengue inactivado purificado. Las Figuras 2C y 2D
20 son diagramas de flujo que ilustran un proceso alternativo para la purificación e inactivación.

Las Figuras 3A y 3B son diagramas de flujo que ilustran los procesos de
ejemplo para la formulación de una composición inmunogénica, la cual
25 comprende el virus de Dengue inactivado purificado.

Las Figuras 4A y 4B son Tablas que ilustran los resultados representativos de la caracterización del producto en seguida de la formulación de las composiciones inmunogénicas que comprenden el virus de Dengue inactivado purificado.

Las Figuras 5A a 5C son Tablas que ilustran los resultados representativos de la caracterización del producto en seguida de la liofilización y reconstitución.

Las Figuras 6A y 6B son representaciones gráficas de las características de estabilidad (6A: Fluorescencia Intrínseca 280/320; 6B: ELISA).

DESCRIPCIÓN DETALLADA

INTRODUCCIÓN

Esta divulgación se refiere a la formulación de composiciones inmunogénicas. En particular, esta divulgación se refiere a formulaciones de composiciones, tales como preparaciones de vacuna y composiciones inmunogénicas a granel, que contienen una o más cepas del virus de Dengue inactivado purificado. Las formulaciones que se dan a conocer en la presente aumentan la recuperación y estabilidad de las composiciones inmunogénicas que contienen el virus de Dengue inactivado purificado, facilitando su producción, almacenamiento y distribución.

Un primer aspecto de esta divulgación se refiere a composiciones que incluyen uno o más virus de Dengue inactivados purificados, en combinación con un agente regulador del pH y un tensoactivo. Favorablemente, estas composiciones son preparaciones a granel del virus de Dengue inactivado,

adecuadas para su formulación en composiciones inmunogénicas (por ejemplo, vacunas para prevenir la infección por, y/o la enfermedad debida a, el virus de Dengue). La adición de un tensoactivo seleccionado mejora la recuperación de un virus de Dengue inactivado antigénicamente conservado, por ejemplo, comparándose con las formulaciones que no incluyen un tensoactivo. Las formulaciones del virus de Dengue inactivado purificado que contienen un tensoactivo, poseen la característica favorable de reducir la adsorción y/o acumulación no específica del virus inactivado, por ejemplo, durante la liofilización, el almacenamiento y la reconstitución.

Las composiciones que se dan a conocer en la presente pueden incluir uno o más de un serotipo del virus de Dengue. Comúnmente, las composiciones incluyen una pluralidad de virus de Dengue a partir de más de un serotipo, es decir, Dengue serotipo 1, Dengue serotipo 2, Dengue serotipo 3 y/o Dengue serotipo 4 (DEN-1, DEN-2, DEN-3, y/o DEN-4, respectivamente). Por ejemplo, la composición puede incluir dos, tres o cuatro virus diferentes a partir de diferentes serotipos del virus de Dengue. En un ejemplo específico, la composición incluye cuatro diferentes virus de Dengue inactivados purificados, cada uno de un serotipo diferente (o capaces de provocar una respuesta inmunitaria específica para cada uno de los diferentes serotipos del virus de Dengue. Por consiguiente, la composición favorablemente incluye cuatro diferentes virus de Dengue inactivados purificados que provocan una respuesta inmunitaria a todos los DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4. Los virus se pueden seleccionar de entre el virus de tipo silvestre (es decir, propagado a partir de, o

correspondiente a, un virus virulento a partir de un aislado que se presenta naturalmente), o el virus se puede seleccionar a partir del virus atenuado. Un virus seleccionado puede ser un virus recombinante. Por ejemplo, un virus recombinante puede ser un virus quimérico, por ejemplo, un virus que tiene un ácido nucleico a partir de un virus de Dengue y un ácido nucleico a partir de otro flavivirus, tal como un virus de Dengue diferente, un virus de fiebre amarilla, o un virus de encefalitis japonesa. Típicamente, un virus quimérico incluye uno o ambos de una proteína de Dengue M y una proteína de Dengue E. Una sola composición puede incluir uno o más virus de tipo silvestre, uno o más virus atenuados, uno o más virus recombinantes, y/o uno o más virus quiméricos, en cualquier combinación.

15 El virus de Dengue inactivado purificado se puede inactivar utilizando agentes inactivadores químicos, físicos, y/o de irradiación, solos o en cualquier combinación. El virus de Dengue inactivado purificado se puede inactivar mediante su exposición a formaldehído, beta-propiolactona (BPL), peróxido de hidrógeno, irradiación ultravioleta e irradiación gamma, o una combinación de cualquiera de estas técnicas.

20 Típicamente, una sola dosis humana de la composición inmunogénica contiene cuando menos 0.1 microgramos, 0.2 microgramos, cuando menos 0.25 microgramos, cuando menos 0.3 microgramos, cuando menos 0.33 microgramos, cuando menos 0.4 microgramos, cuando menos 0.5 microgramos, cuando menos 1.0 microgramo, o cuando menos 2.0
25 microgramos, o cuando menos 3.0 microgramos, o cuando menos 5

microgramos, o cuando menos 10.0 microgramos (o cualquier cantidad entre 0.1 y 10.0 microgramos) de cada serotipo del virus. Típicamente, una sola dosis humana de la composición inmunogénica contiene no más de 100 microgramos de cada serotipo del virus, por ejemplo, no más de 90 microgramos, o no más de 80 microgramos, o no más de 75 microgramos, o no más de 70 microgramos, o no más de 60 microgramos, o no más de 50 microgramos, o no más de 40 microgramos, o no más de 30 microgramos, o no más de 20 microgramos, o no más de 10 microgramos (o cualquier cantidad entre 10 y 100 microgramos) de cada serotipo del virus. Por ejemplo, una sola dosis humana de la composición inmunogénica pueden incluir entre 0.1 y 10 microgramos, o entre 0.25 y 5 microgramos, por ejemplo, administrados en un volumen de entre 0.05 y 2 mililitros, tal como en un volumen 0.5 y 1.5 mililitros.

15 En ciertas modalidades, los virus de Dengue inactivados purificados son adsorbidos sobre una sal de aluminio ("alum"), tal como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio o hidroxifosfato de aluminio. Cuando se incluye una pluralidad de virus de Dengue, cada uno puede ser adsorbido sobre la misma sal de aluminio, o diferentes virus pueden ser adsorbidos sobre diferentes sales
20 de aluminio. Por consiguiente, en un aspecto, la presente divulgación se refiere a una composición inmunogénica que contiene cuando menos un virus de Dengue inactivado purificado adsorbido (por ejemplo, previamente adsorbido) sobre una sal de aluminio, en combinación con un regulador y un tensoactivo.

25 En el contexto de las composiciones inmunogénicas que se dan a conocer en la presente (y las preparaciones a granel a partir de las cuales se

formulan las composiciones inmunogénicas terminadas), el tensoactivo se selecciona de tal manera que sea adecuado para su administración a un sujeto, en particular un sujeto humano. En ciertas modalidades, el tensoactivo se selecciona de tal manera que sea adecuado para su administración parenteral, por ejemplo, para su administración intramuscular, subcutánea, transcutánea o intradérmica.

Los tensoactivos de ejemplo adecuados para las composiciones contra el Dengue que se dan a conocer en la presente incluyen tensoactivos de poloxámeros, así como otros tensoactivos adecuados para su administración a un sujeto humano. Por consiguiente, los tensoactivos adecuados (en adición a los tensoactivos de poloxámeros) se pueden seleccionar a partir del grupo que consiste en: tensoactivos de polisorbato, tensoactivos de octoxinol, tensoactivos de polidocanol, tensoactivos de estearato de polioxilo, tensoactivos de aceite de ricino de polioxilo, tensoactivos de N-octil-glucósido, tensoactivos de hidroxiestearato de macrogol 15, y combinaciones de los mismos. En ciertas modalidades, los tensoactivos de poloxámeros son en particular adecuados para las formulaciones en donde los virus de Dengue inactivados purificados no sean adsorbidos sobre una sal de aluminio.

20

Los tensoactivos de poloxámeros son copolímeros lineales de polietilen-polipropilen-glicol. Comercialmente, éstos son con frecuencia referidos como tensoactivos Pluronic. En ciertas modalidades, el tensoactivo de poloxámero se selecciona a partir de un copolímero de polietilen-polipropilen-glicol con un peso molecular promedio de cuando menos aproximadamente 1,000 kD, y un peso

25

molecular promedio de no más de aproximadamente 15,000 kD. En una modalidad específica, la composición inmunogénica se formula con un copolímero de polietilen-polipropilen-glicol, poloxámero 188, el cual es vendido comercialmente bajo las marcas comerciales registradas Pluronic^{MR} F 68, Lutrol^{MR} F 68, y Kolliphor^{MR} PI 88, el cual tiene un peso molecular promedio de 8,600 kD, con un peso molecular del polioxipropileno de 1,800 gramos/mol, y un contenido de polioxietileno del 80 por ciento.

Las composiciones (preparaciones y composiciones inmunogénicas a granel) también incluyen uno o más agentes reguladores. El virus de Dengue pierde inmunogenicidad bajo condiciones ácidas, y por consiguiente, el agente regulador del pH se selecciona para mantener el pH cerca o mayor que el neutro. El agente o los agentes reguladores del pH, típicamente se seleccionan para mantener el pH de la composición en o mayor a un pH de 6.4, de preferencia por arriba de un pH de 6.8, y de una manera muy preferible, por arriba de un pH de 7.0, por ejemplo, en o alrededor de un pH de 7.4. El agente regulador del pH se selecciona para mantener el pH deseado en el contexto de los otros componentes de la composición inmunogénica formulada, tomando en consideración que ciertos componentes adicionales (por ejemplo, ciertos adyuvantes) pueden requerir de un ajuste de la cantidad o elección del agente regulador del pH. En una modalidad, el agente regulador del pH incluye uno o ambos de fosfato de sodio y fosfato de potasio. En otra modalidad, el agente regulador del pH incluye Tris-(hidroxi-metil)-amino-metano ("Tris").

Las preparaciones y composiciones inmunogénicas a granel también

pueden incluir componentes adicionales, tal como una o más sales minerales, por ejemplo, para modificar o mantener la tonicidad en un rango deseado. Más comúnmente, la sal es una sal mineral, tal como cloruro de sodio. Esta sal se agrega favorablemente en la cantidad necesaria para mantener la composición formulada en o casi isotónica. La cantidad precisa difiere dependiendo de los otros componentes en la formulación, más particularmente de la elección de los agentes reguladores del pH, y puede ser determinada sin una indebida experimentación por aquéllos de una experiencia ordinaria en este campo.

Las preparaciones y composiciones inmunogénicas a granel que se dan a conocer en la presente también pueden incluir uno o más excipientes para mejorar la estabilidad estructural y/o inmunológica (o para modificar otras propiedades de la formulación, tales como la tonicidad) del virus de Dengue inactivado purificado en solución y/o durante el procesamiento, por ejemplo, la

15 liofilización. En algunas modalidades, el excipiente incluye un azúcar formador de cristal o poliol. En ciertas modalidades, el azúcar o el poliol formador de cristal se selecciona a partir del grupo que consiste en: sacarosa, trehalosa, manosa, manitol, rafinosa, lactitol, sorbitol y ácido lactobiónico, glucosa,

20 maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, maltosa, lactosa, iso-maltosa, maltitol, palatinit, estaquiosa, melezitosa, dextrano, o una combinación de los mismos. En una modalidad específica, el excipiente comprende sacarosa. Opcionalmente, el azúcar o poliol se puede utilizar en combinación con un aminoácido, tal como glicina, alanina, arginina, lisina y/o glutamina.

25 En ciertas modalidades, la composición es una formulación líquida, por

ejemplo, una solución o suspensión. En otras modalidades, la composición se prepara liofilizada, y se vuelve a suspender antes de la administración. Por ejemplo, la composición inmunogénica se puede formular en una formulación líquida isotónica para su administración mediante inyección.

En ciertas modalidades, la composición inmunogénica se formula para su administración a un sujeto humano. Para su administración a un sujeto humano, la composición inmunogénica se puede formular en una cantidad de una sola dosis de cuando menos 0.05 mililitros, y no más de 2 mililitros, tal como una cantidad de una sola dosis de entre 0.5 y 1.5 mililitros.

Opcionalmente, las composiciones inmunogénicas que se dan a conocer en la presente pueden incluir un adyuvante. En algunas modalidades, por ejemplo, las modalidades en donde el virus de Dengue inactivado purificado es adsorbido sobre alum, la sal de aluminio sirve como un adyuvante. En otras
15 modalidades, el adyuvante es un adyuvante sin aluminio. Si se combina con, por ejemplo, se adsorbe sobre, alum o no, el adyuvante puede incluir uno o más componentes inmunoestimulantes. El componente inmunoestimulante puede incluir uno o más de: Una emulsión de aceite y agua, un liposoma, un
20 lipopolisacárido, una saponina, y un oligonucleótido, como se describe con mayor detalle más adelante en la presente.

Otro aspecto de esta divulgación se refiere a métodos para formular preparaciones antigénicas y composiciones inmuno-génicas a granel, las cuales comprenden uno o más virus de Dengue inactivados purificados. Este método
25 involucra: proporcionar una solución que comprende un agente regulador del

pH y un tensoactivo; y mezclar con la solución uno o más virus de Dengue inactivados purificados. En algunas modalidades, el uno o más virus de Dengue inactivados purificados son adsorbidos sobre una sal de aluminio (por ejemplo, para producir una preparación a granel previamente adsorbida del virus de Dengue inactivado) antes de mezclar con la solución. Típicamente, una sola cepa del virus de Dengue inactivado purificado es adsorbida sobre la sal de aluminio (por ejemplo, hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, o hidroxifosfato de aluminio) para producir un mono-volumen previamente adsorbido. Para producir a composición inmunogénica multivalente, los mono-volúmenes individuales se combinan entonces en la proporción deseada (por ejemplo, 1:1:1:1 basándose en peso, o se ajusta basándose en la inmunogenicidad relativa) con la solución que contenga el agente regulador del pH y el tensoactivo.

15 Típicamente, los virus de Dengue inactivados purificados se agregan a una solución adecuada (en la formulación final) para su administración parenteral. En algunas modalidades, la solución es una solución isotónica. En algunas modalidades, la solución también incluye uno o más excipientes, tales como una sal y/o un azúcar formador de cristal o poliol.

20 En una modalidad, al agua para inyecciones (por ejemplo, agua estéril sin endotoxinas), se le agrega un azúcar formador de cristal o poliol, un agente regulador, una sal y tensoactivo (como se discute anteriormente), por ejemplo, en un orden secuencial. Los virus de Dengue inactivados purificados, como se discute anteriormente, se agregan a la solución preparada.

25 En algunas modalidades, el método entonces involucra liofilizar la

solución (por ejemplo, la preparación a granel) que contenga los virus de Dengue inactivados purificados, para producir una composición liofilizada. En las modalidades que involucran la liofilización de la composición inmunogénica, por ejemplo, para su almacenamiento y/o distribución, la composición liofilizada típicamente se vuelve a suspender en una cantidad adecuada, por ejemplo, de 0.05 a 2 mililitros, típicamente entre 0.5 y 1.5 mililitros, por ejemplo, 0.5 ó 1.0 ó 1.5 mililitros, de una solución farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyecciones, antes de la administración. Opcionalmente, la solución farmacéuticamente aceptable incluye cuando menos un componente inmunoestimulante, como se da a conocer anteriormente.

En otro aspecto, esta divulgación se refiere a métodos para reducir la adsorción y/o la acumulación no específica de un virus de Dengue inactivado purificado (o de una pluralidad de los mismos), o a una composición que los
15 contiene, mediante la formulación de los virus de Dengue inactivados como se describe anteriormente.

En todavía otro aspecto, esta divulgación se refiere a un método para mejorar la recuperación de un virus de Dengue inactivado antigénicamente conservado (o una pluralidad de los mismos), o a una composición que los
20 contiene, mediante la formulación de los virus de Dengue inactivados como se describe anteriormente.

TERMINOLOGÍA

A menos que se expliquen de otra manera, todos los términos técnicos y
25 científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado que es

comúnmente entendido por un experto ordinario en el campo al que pertenece esta divulgación. Las definiciones de los términos comunes en biología molecular se pueden encontrar en Benjamin Lewin, *Genes V*, publicado por Oxford University Press, 1994 (ISBN 0-19-854287-9); Kendrew y colaboradores (Editores), *The Encyclopedia of Molecular Biology*, publicado por Blackwell Science Ltd., 1994 (ISBN 0-632-02182-9); y Robert A. Meyers (Editor), *Molecular Biology and Biotechnology: a Comprehensive Desk Reference*, publicado por VCH Publishers, Inc., 1995 (ISBN 1-56081-569-8).

Los términos en singular "un", "uno", y "el" incluyen los referentes en plural a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. De una manera similar, la palabra "o" pretende incluir "y" a menos que el contexto lo indique claramente de otra manera. El término "pluralidad" se refiere a dos o más. Además se debe entender que todos los tamaños de bases o los tamaños de aminoácidos, y todos los valores de peso molecular o de masa molecular, dados para los ácidos nucleicos o polipéptidos son aproximados, y se proporcionan para su descripción. Adicionalmente, las limitaciones numéricas dadas con respecto a concentraciones o niveles de una sustancia, tal como un antígeno, pretenden ser aproximadas. Por consiguiente, cuando se indica que una concentración es de cuando menos (por ejemplo) 20 microgramos, se pretende que la concentración sea entendida como de cuando menos aproximadamente (o "alrededor de" o "~") 20 microgramos.

Aunque en la práctica o prueba de esta divulgación se pueden utilizar métodos y materiales similares o equivalentes a aquéllos descritos en la

presente, los métodos y materiales adecuados se describen más adelante. El término "comprende" significa "incluye". Por consiguiente, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, la palabra "comprende", y sus variaciones tales como "comprenden" y "comprendiendo", se entenderán para implicar la inclusión de un compuesto o una composición (por ejemplo, ácido nucleico, polipéptido, antígeno) o un paso, o un grupo de compuestos o pasos mencionados, pero no la exclusión de cualesquiera otros compuestos, composiciones, pasos, o grupos de los mismos. La abreviatura, "e.g." se deriva a partir del latín *exempli gratia*, y se utiliza en la presente para indicar un ejemplo no limitante. Por consiguiente, la abreviatura " e.g." es un sinónimo con el término "por ejemplo".

Con el objeto de facilitar la revisión de las diferentes modalidades de esta divulgación, se proporcionan las siguientes explicaciones de los términos. Se
15 pueden proporcionar términos y explicaciones adicionales en el contexto de esta divulgación.

Una "preparación a granel" de un virus de Dengue inactivado se utiliza en la presente para referirse a un virus de Dengue en la forma antigénica final, con respecto a la purificación e inactivación, pretendida para su administración a un
20 sujeto. Una preparación a granel o formulación a granel se puede procesar adicionalmente, por ejemplo, mediante dilución, concentración, tal como mediante liofilización y resuspensión, y/o empackado, por ejemplo, en frascos o jeringas de múltiples dosis o de una sola dosis para su administración como una
25 composición inmunogénica o vacuna.

El término "purificación" (por ejemplo, con respecto a un patógeno o a una composición que contenga un patógeno, tal como un virus de Dengue) se refiere al proceso de remover los componentes de una composición, cuya presencia cual no se desea. La purificación es un término relativo, y no requiere que se remuevan todas las trazas del componente indeseable a partir de la composición. En el contexto de la producción de vacunas, la purificación incluye procesos tales como centrifugación, dialización, cromatografía de intercambio de iones, y cromatografía de exclusión de tamaños, purificación de afinidad, o precipitación. Por consiguiente, el término "purificado" no requiere de una pureza absoluta; más bien, se pretende como un término relativo. Por consiguiente, por ejemplo, una preparación de virus purificada es una en donde el virus está más enriquecido de lo que lo está en su medio ambiente generativo, por ejemplo, dentro de una célula o población de células en donde se replique naturalmente o en un medio ambiente artificial. Una preparación de virus sustancialmente puros se puede purificar de tal manera que el virus o el componente viral deseado represente cuando menos el 50 por ciento del contenido de proteína total de la preparación. En ciertas modalidades, un virus sustancialmente puro representará cuando menos el 60 por ciento o cuando menos el 70 por ciento, tal como cuando menos el 80 por ciento, cuando menos el 85 por ciento, cuando menos el 90 por ciento, o cuando menos el 95 por ciento o más del contenido de proteína total de la preparación. De una manera alternativa, la purificación de una preparación de virus se puede evaluar como la reducción en los contaminantes, tales como la proteínas de la célula

huésped, en la preparación. De conformidad con lo anterior, una preparación de un virus sustancialmente puro (por ejemplo, virus de Dengue inactivado purificado) típicamente incluye menos del 30 por ciento o menos del 25 por ciento de proteínas residuales de la célula huésped. Por ejemplo, una preparación o composición inmunogénica a granel, la cual comprende un virus de Dengue inactivado purificado, puede incluir menos del 20 por ciento de proteína residual de la célula huésped, o incluso menos del 15 por ciento o del 10 por ciento o menos (por ejemplo, medido sobre una base de peso/peso).

El término "inactivado" en el contexto de una vacuna de virus de Dengue significa que el componente antigénico (por ejemplo, el virus) es incapaz de tener la replicación *in vivo* o *in vitro*. Por ejemplo, el término inactivado abarca un virus que se ha replicado, por ejemplo, *in vitro*, y entonces se ha matado utilizando medios químicos o físicos, de tal manera que ya no es capaz de replicarse. El término también puede incluir los antígenos producidos por un procesamiento adicional (por ejemplo, división, fraccionamiento, y similares), y los componentes producidos por medios recombinantes, por ejemplo, en un cultivo celular.

Un "adyuvante" es un agente que potencia la producción de una respuesta inmunitaria específica del antígeno, comparándose con la administración del antígeno en ausencia del agente. Los adyuvantes comunes incluyen los adyuvantes que contienen aluminio que incluyen una suspensión de minerales (o de sales minerales, tales como hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, hidroxifosfato de aluminio) sobre la cual se adsorbe el antígeno.

Otros adyuvantes incluyen uno o más componentes inmunoestimulantes que contribuyen a la producción de una respuesta inmunitaria específica del antígeno mejorada. Los componentes inmunoestimulantes incluyen emulsiones de aceite y agua, tales como agua en aceite y aceite en agua (y variantes de las mismas, incluyendo emulsiones dobles y emulsiones reversibles), liposacáridos, lipopolisacáridos, ácidos nucleicos inmunoestimulantes (tales como oligonucleótidos CpG), liposomas, agonistas del receptor tipo Toll (en particular, los agonistas de TLR2, TLR4, TLR7/8 y TLR9), y diferentes combinaciones de estos componentes. Los adyuvantes pueden incluir combinaciones de componentes inmunoestimulantes.

Una "composición inmunogénica" es una composición de materia adecuada para su administración a un sujeto humano o animal (por ejemplo, en un establecimiento experimental) que es capaz de provocar una respuesta
15 inmunitaria específica, por ejemplo, contra un patógeno, tal como el virus de Dengue. Como tal, una composición inmunogénica incluye uno o más antígenos (por ejemplo, virus enteros purificados o subunidades antigénicas, por ejemplo, polipéptidos de los mismos) o epítopos antigénicos. Una composición
20 inmunogénica también puede incluir uno o más componentes adicionales capaces de provocar o mejorar una respuesta inmunitaria, tales como un excipiente, vehículo, y/o adyuvante. En ciertas instancias, las composiciones inmunogénicas se administran para provocar una respuesta inmunitaria que proteja al sujeto contra los síntomas o las condiciones inducidas por un
25 patógeno. En algunos casos, se previenen (o se tratan, por ejemplo, se reducen

o se mitigan) los síntomas o la enfermedad causada por un patógeno, mediante la inhibición de la replicación del patógeno (por ejemplo, el virus de Dengue) en seguida de la exposición del sujeto al patógeno. En el contexto de esta divulgación, se entenderá que el término composición inmunogénica abarca las composiciones que se pretendan para su administración a un sujeto o a una población de sujetos para el propósito de provocar una respuesta inmunitaria protectora o paliativa contra el Dengue (es decir, composiciones de vacuna o vacunas).

Una "respuesta inmunitaria" es una respuesta de una célula del sistema inmunológico, tal como una célula-B, una célula-T, o un monocito, a un estímulo. Una respuesta inmunitaria puede ser una respuesta de células-B, la cual dé como resultado la producción de anticuerpos específicos, tales como anticuerpos neutralizantes específicos del antígeno. Una respuesta inmunitaria
15 también puede ser una respuesta de células-T, tal como una respuesta de CD4+ o una respuesta de CD8+. En algunos casos, la respuesta es específica para un antígeno particular (es decir, una "respuesta específica del antígeno"). Si el antígeno se deriva a partir de un patógeno, la respuesta específica del
20 antígeno es una "respuesta específica del patógeno". Una "respuesta inmunitaria protectora" es una respuesta inmunitaria que inhibe una función o actividad perjudicial de un patógeno, reduce la infección por un patógeno, o disminuye los síntomas (incluyendo la muerte) que resulten a partir de la infección por el patógeno. Una respuesta inmunitaria protectora se puede medir,
25 por ejemplo, por la inhibición de la replicación viral o de la formación de placa

en un ensayo de reducción de placa o en un ensayo de neutralización ELISA, o mediante la medición de la resistencia a la agresión de un patógeno *in vivo*.

Un "sujeto" es un organismo vertebrado multicelular vivo. En el contexto de esta divulgación, el sujeto puede ser un sujeto experimental, tal como un animal no humano, por ejemplo, un ratón, una rata de algodón, o un primate no humano. De una manera alternativa, el sujeto puede ser un sujeto humano.

Un "agente regulador del pH" es un compuesto o una composición que sola o en combinación aumenta la capacidad de una solución para mantener o resistir el cambio en el pH cuando se agrega un ácido o un álcali. El término "agente regulador del pH" abarca una amplia variedad de compuestos y composiciones, típicamente, cualquiera de los ácidos débiles o de las bases débiles, que cuando está presente en solución con su base o ácido conjugado, respectivamente, se puede utilizar para mantener el pH en un valor deseado o dentro de un intervalo deseado.

Un "tensoactivo", o un agente de actividad superficial, es una molécula anfifílica caracterizada por una cabeza hidrofílica y una cola hidrofóbica. Cuando es adsorbido en la superficie de un líquido, un tensoactivo actúa para reducir la tensión superficial del líquido, la tensión interfacial entre dos líquidos, o la tensión entre el líquido y un sólido. Un tensoactivo puede actuar como detergente, agente humectante, emulsionante, agente espumante, y/o dispersante.

Las composiciones que se dan a conocer en la presente incluyen uno o más antígenos de virus de Dengue inactivado purificado. En diversos aspectos,

las composiciones son preparaciones elaboradas a granel del virus de Dengue inactivado, por ejemplo, en una formulación líquida, en preparaciones sólidas (por ejemplo, liofilizadas) a una escala seleccionada, o en composiciones inmunogénicas formuladas para su administración a un sujeto (típicamente a un sujeto humano). Por ejemplo, las preparaciones (ya sean líquidas o sólidas) y/o composiciones inmunogénicas a granel pueden incluir una sola cepa del virus de Dengue (es decir, una composición monovalente, tal como una preparación a granel monovalente o una composición inmunogénica monovalente), o pueden contener más de una cepa del virus de Dengue (es decir, una composición multivalente, tal como una preparación a granel multivalente o una composición inmunogénica multivalente). Típicamente, una composición multivalente contiene cepas seleccionadas a partir de diferentes serotipos. Debido a que hay cuatro serotipos del virus de Dengue que pueden provocar enfermedad, es decir, Dengue tipo uno (DEN-1), Dengue tipo dos (DEN-2), Dengue tipo tres (DEN-3), y Dengue tipo cuatro (DEN-4), y debido a que los anticuerpos no neutralizantes de reacción cruzada predisponen a las formas más graves de la enfermedad de Dengue, se puede seleccionar un representante de cada serotipo para incluirse en la preparación a granel y en la vacuna final, con el objeto de garantizar la protección contra la enfermedad de cualquiera de los cuatro serotipos. Por consiguiente, en una modalidad, la composición inmunogénica es una composición tetravalente que incluye cepas seleccionadas a partir de cada uno del cuatro serotipos del virus de Dengue.

Los virus usados como antígenos se pueden seleccionar a partir de

esencialmente cualquier cepa (o cepas) del virus de Dengue. Por ejemplo, se puede seleccionar una cepa del virus para cada serotipo, la cual se selecciona basándose en su conformidad con una secuencia definida (por ejemplo, en consenso) para el serotipo, tal como una secuencia en consenso de DEN-1, una secuencia en consenso de DEN-2, una secuencia en consenso de DEN-3, o una secuencia en consenso de DEN-4. Este virus se puede presentar naturalmente o puede ser sintético. Por ejemplo, se puede seleccionar una cepa del virus para correlacionarse con una cepa prevaleciente (por ejemplo, una cepa que se presente naturalmente o de "tipo silvestre" cepa) en el área o población en donde se pretenda administrar la vacuna. Otra opción es seleccionar las cepas para cada serotipo como un asunto de conveniencia basándose en la disponibilidad o en la experiencia previa. Por ejemplo, se describen cepas de ejemplo en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,254,873, la cual se incorpora como referencia a la presente. Se dan a conocer cepas adecuadas adicionales, por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 7,226,602, la cual también se incorpora a la presente como referencia. Se pueden encontrar cepas adicionales, por ejemplo, en la base de datos del genoma viral de VBRC (http://athena.bioc.uvic.ca/organisms/Flaviviridae/Dengue/Curated_genes), y en la base de datos del virus de Dengue (<http://www.broad.mit.edu/annotation/viral/Dengue/ProjectInfo.html>).

En el contexto de una vacuna de virus de Dengue inactivado purificado, se pueden utilizar cepas ya sea virulentas o bien atenuadas. Típicamente, las

cepas virulentas se propagan hasta una titulación más alta en las células huésped, facilitando la producción a una escala comercial. Sin embargo, las cepas virulentas requieren de un cuidado especial en el manejo para prevenir la infección del personal involucrado en su elaboración. Las cepas atenuadas, por ejemplo, aquellas desarrolladas mediante su adaptación a la producción en células cultivadas, y a la selección por la virulencia reducida y/o por la replicación reducida en los vectores de mosquito de Dengue, requieren de menos precauciones de manejo, pero pueden ser difíciles de producir. Las cepas atenuadas de ejemplo adecuadas para utilizarse en el contexto de una composición inmunogénica que contenga un virus de Dengue inactivado, se describen en la Publicación Internacional Número WO 2000/057907 y en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 6,638,514, y en la Publicación Internacional Número WO 2000/058444 y en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 6,613,556, en la Publicación Internacional Número WO 2002/066621 (Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 2004052818), en la Publicación Internacional Número WO 2000/057904 (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,528,065), en la Publicación Internacional Número WO 2000/057908, en la Publicación Internacional Número WO 2000/057909 (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,511,667); en la Publicación Internacional Número WO 2000/057910 (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,537,557), en la Publicación Internacional Número WO 2002/095075 (por ejemplo, en la Patente de los Estados Unidos de

Norteamérica Número 7,226,602), y en la Publicación Internacional Número WO 2002/102828 (Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 7,569,383), las cuales se incorporan a la presente como referencia.

Los virus de "Dengue" quiméricos también son adecuados en el contexto de las formulaciones que se dan a conocer en la presente. Este virus quimérico típicamente expresa la proteína de envoltura del virus de Dengue, por ejemplo, utilizando una estructura base de ácido nucleico de un virus de Dengue diferente o de un flavivirus diferente, tal como un virus de fiebre amarilla o un virus de encefalitis japonesa.

Los ejemplos de los virus de Dengue quiméricos se pueden encontrar, por ejemplo, en la Publicación Internacional Número WO 98/37911 (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 6,696,281; 6,962,708), en las Publicaciones Internacionales Números WO 96/40933 y WO 2001060847
15 (Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 7,094,411; 7,641,909; 8,025,887), y en la Patente Europea Número EP1159968. Los métodos para la producción de estos virus Dengue quiméricos también se pueden encontrar en la Publicación Internacional Número WO 03/101397. Las
20 divulgaciones de estas solicitudes y patentes publicadas se incorporan a la presente como referencia para el propósito de proporcionar los virus de Dengue quiméricos de ejemplo adecuados para utilizarse en el contexto de las formulaciones y métodos que se dan a conocer en la presente.

Por consiguiente, las cepas seleccionadas se eligen típicamente de entre
25 las numerosas cepas disponibles para replicarse en las células que sean

adecuadas para la producción de los materiales destinados para uso humano (por ejemplo, las células que estén certificadas como libres de patógenos). Por ejemplo, (i) las cepas se pueden rastrear para identificar los virus que crezcan hasta las titulaciones más altas, por ejemplo, desde una titulación de cuando menos aproximadamente 5×10^6 unidades formadoras de placas (pfu)/mililitro, de preferencia de cuando menos 1×10^7 unidades formadoras de placas (pfu)/mililitro o más en las líneas celulares de elección; (ii) seleccionar las cepas del virus de Dengue que crezcan hasta las titulaciones más altas en las líneas celulares de elección; y (iii) adaptar adicionalmente las cepas seleccionadas para un mejor crecimiento mediante pasos adicionales desde una hasta varias veces en las líneas celulares de elección. Los virus seleccionados (por ejemplo, elegidos a partir de los cuatro serotipos del virus de Dengue) se pueden adaptar adicionalmente para crecer hasta altas titulaciones mediante pasos adicionales del cultivo celular, o mediante manipulación genética para hacer lotes de siembra de producción y maestros de alta titulación.

Los métodos para la producción de virus de Dengue son conocidos en la materia, y se describen en un detalle suficiente para guiar a un experto ordinario en este campo, por ejemplo, en la Solicitud del TCP Publicada Número WO 2010/094663, y en la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 2011318407. Los métodos para la producción de virus en condiciones sin suero también se pueden encontrar, por ejemplo, en la Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número

20060183224. Las divulgaciones de estas solicitudes de patente publicadas se incorporan a la presente como referencia para proporcionar detalles adicionales con respecto a la propagación y a la purificación del virus de Dengue para incluirse en las preparaciones y composiciones inmunogénicas a granel que se dan a conocer en la presente. De una manera similar, los métodos para inactivar el virus de Dengue para producir un virus de Dengue inactivado purificado, están bien establecidos en la materia, e incluyen exposición a agentes químicos, físicos y/o de irradiación. Los métodos adecuados incluyen, por ejemplo, exposición a formaldehído, beta-propiolactona (BPL), peróxido de hidrógeno, irradiación ultravioleta e irradiación gamma, o combinaciones de los mismos. Los detalles de estos métodos se pueden encontrar, por ejemplo, en la Solicitud del TCP Publicada Número WO 2010/094663 (Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 2011318407), y en la

15 Publicación de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 20070031451, las cuales se incorporan a la presente como referencia para el propósito de ilustrar los métodos de ejemplo para la inactivación del virus de Dengue.

20 Los procedimientos de ejemplo para la purificación del virus de Dengue se ilustran en los diagramas de flujo de las Figuras 2A a 2D. Para producir las cantidades de virus de Dengue adecuadas para uso comercial, se hace crecer una línea celular susceptible en un cultivo *in vitro* en un medio adecuado. Típicamente, las células son células de mamífero, tales como células epiteliales

25 de riñón o de pulmón. Existen varias líneas celulares adecuadas, por ejemplo,

células de riñón de mono verde africano, tales como las células Vero, células MRC-5, células MDCK, y células FRhL-2. De una manera alternativa, se pueden utilizar células de insectos, en particular células de mosquito, tales como la línea C6/36 de *Aedes albopictus*. Las células se pueden cultivar en un medio AF animal ya sea conteniendo suero o libre de suero (medio AF). Opcionalmente, el medio se complementa inicialmente o periódicamente con aditivos, tales como glucosa, aminoácidos, factores de crecimiento sintéticos, u otras proteínas. Las células se expanden, típicamente a través de una secuencia de aumentar el tamaño del recipiente (por ejemplo, matraz de 175 cm²; CF₂ (1,200 cm²); CF₁₀ (6,000 cm²); CF₄₀ (bio-reactor de 50 litros); bio-reactor de 200 litros). En el tamaño de recipiente más grande, es común emplear microvehículos en suspensión para la adhesión de las células. Opcionalmente, el medio se suministra mediante perfusión, o los cultivos se pueden alimentar periódicamente. En ciertas modalidades, las células son células Vero, las cuales se pueden cultivar en bio-reactores a escala comercial.

Las células se hacen crecer hasta la densidad a la escala deseada, y se infectan con el virus (por ejemplo, las cepas seleccionadas para proporcionar los determinantes antigénicos de DEN-1, DEN-2, DEN-3 y/o DEN-4). Las células se infectan a una multiplicidad de infección (MOI) adecuada (por ejemplo, de 0.01 a 0.1 MOI, por ejemplo, 0.05 MOI) con las cepas seleccionadas. Cuando se emplea un medio que contiene suero para el precultivo y/o la infección, el medio se puede intercambiar por un medio AF para reducir el contenido de proteína extraña durante la cosecha y la fase de

purificación. Por ejemplo, después de una fase de infección inicial de 1 a 4 días, por ejemplo, de aproximadamente 2 días, el medio puede ser intercambiado hasta un medio AF. Opcionalmente, el medio AF es inicialmente o periódicamente complementado con glucosa, aminoácidos, o similares. Después de un período adecuado para el crecimiento viral, por ejemplo, entre un mínimo de 6 y 8 días, el virus se cosecha a partir de las células. Opcionalmente, el virus se puede cosechar crecientemente a intervalos (por ejemplo, a intervalos de 2 días), empezando en aproximadamente 6 días después de la infección. La cosecha puede continuar favorablemente durante un período de varios días, por ejemplo, hasta el día 10, tal como hasta el día 12, o el día 14, o más tiempo.

El medio que contiene el virus se aclara, típicamente a través de una serie de tamaños de poros decrecientes (por ejemplo, 8 micras, 0.6 micras, 0.45 micras, 0.2 micras). Los filtros y aparatos de filtración comercialmente disponibles adecuados son bien conocidos en la materia, y pueden ser seleccionados por los expertos en este campo. Los aparatos de filtración de ejemplo incluyen, por ejemplo, los aparatos de filtración Millipore^{MR}, Millistak^{MR}, DOHC y Sartobran^{MR} P. Opcionalmente, la cosecha del virus aclarada se puede almacenar congelada a -70°C si se desea.

Entonces la suspensión del virus se concentra (por ejemplo, de 20 a 50 veces o más, tal como 30 veces ó 40 veces), y el medio se intercambia por un regulador adecuado (por ejemplo, suero regulado con fosfato (PBS), Citrato 125 mM, pH de 7.6), por ejemplo, mediante ultrafiltración y diafiltración. Los

reguladores seleccionados en esta etapa y a través de toda la purificación se seleccionan para mantener el pH, reducir la acumulación, y conservar la antigenicidad del virus durante el procesamiento. Los reguladores indicados en la presente son ejemplos solamente, y aquéllos con experiencia en la materia pueden seleccionar soluciones reguladoras alternativas para los propósitos indicados. La concentración inicial y el intercambio de regulador es seguido por una filtración adicional y cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) utilizando, por ejemplo, las resinas Sephacryl S-400HR o Sepharose 4 FF. Opcionalmente, antes de un procesamiento adicional, la suspensión de virus aclarada se inactiva mediante su exposición a irradiación ultravioleta (UV) (de entre 100 y 500 J/m, por ejemplo, de 200 J/m), ya sea antes o después del paso de concentración.

15 Opcionalmente, el paso de cromatografía de exclusión de tamaños puede ser seguido por uno o más pasos para remover los ácidos nucleicos residuales, tales como el ADN celular. Para este propósito, un método adecuado es la cromatografía de membrana, por ejemplo, la cromatografía de membrana Sartobind-Q (en el modo negativo), y filtración. En general se
20 prefiere que el ADN residual se reduzca hasta menos o igual a 100 picogramos de ADN por microgramo de proteína (o hasta menos de 100 picogramos/dosis).

Favorablemente, en esta etapa, antes de la inactivación, se puede agregar al regulador un tensoactivo, tal como un tensoactivo de Poloxámero, como se da a conocer en la presente, y se selecciona para incluirse en la
25 preparación y/o composición inmunogénica a granel. De una manera

alternativa, el tensoactivo se puede agregar al regulador en seguida de la inactivación. El virus entonces se inactiva, mediante cualquiera de uno o más métodos conocidos en la técnica, incluyendo mediante inactivación química y/o mediante irradiación. La inactivación química, por ejemplo, mediante formaldehído, beta-propiolactona (BPL), o mediante peróxido de hidrógeno, se ha descrito en este campo para la inactivación de virus de Dengue, y se puede emplear para proporcionar el virus de Dengue inactivado purificado en el contexto de las formulaciones que se dan a conocer en la presente. Por ejemplo, el virus se puede inactivar Mediante su exposición a formaldehído (a aproximadamente 100 microgramos/mililitro) durante un período típicamente de entre 7 y 10 días a temperatura ambiente. Opcionalmente, la suspensión se filtra (por ejemplo, 0.22 micras) en un punto del tiempo intermedio durante el proceso de inactivación, tal como en el día 2, 3, 4, ó 5, para remover los aglomerados y mejorar la exposición al formaldehído. El medio de inactivación química se puede utilizar individualmente o en combinación. De una manera alternativa, o en combinación con uno o más elementos químicos, el virus se puede inactivar mediante irradiación (por ejemplo, irradiación ultravioleta (UV) o gamma). Luego se remueve el formaldehído u otro compuesto inactivador químico, o se neutraliza (por ejemplo, en el caso del formaldehído, con bisulfito de sodio). Se puede emplear ultrafiltración/diafiltración para remover el agente de inactivación química y poner el virus purificado en un regulador adecuado para la subsiguiente formulación. El virus de Dengue inactivado purificado entonces se filtra finalmente para esterilizarse, con el fin de producir una

preparación a granel del virus de Dengue inactivado. Opcionalmente, se agrega sacarosa a la formulación final de la preparación a granel. Si se desea, la preparación a granel final se puede almacenar congelada, por ejemplo, a -70°C .

Los virus inactivados purificados seleccionados se formulan como se describe en la presente para producir preparaciones y composiciones inmunogénicas a granel que sean estables e inmunogénicas, y las cuales se puedan producir a una escala comercial sin la pérdida sustancial durante la liofilización y reconstitución que se observa con los métodos y formulaciones anteriormente disponibles. Los métodos descritos anteriormente pueden dar como resultado una preparación de virus de Dengue inactivado purificado que es cuando menos el 70 por ciento, y típicamente cuando menos el 80 por ciento material viral de Dengue. La preparaciones contienen menos del 25 por ciento, y típicamente menos del 20 por ciento de proteínas de la célula huésped.

15 Adicionalmente, de acuerdo con los métodos descritos anteriormente, se mejora sustancialmente la recuperación del virus de Dengue inactivado purificado, de tal manera que se recupera más del 90 por ciento (o más del 95 por ciento) del material viral en la preparación final. Es decir, se observa una pérdida de menos
20 del 10 por ciento, o incluso de menos del 5 por ciento del material viral en seguida de la filtración final por 0.2 micras del material a granel purificado inactivado. Por consiguiente, la presente divulgación proporciona, entre otras cosas, un método para reducir cuando menos una de la adsorción y/o la acumulación no específica de un virus de Dengue inactivado purificado, y un
25 método para mejorar la recuperación de un virus de Dengue inactivado

antigénicamente conservado mediante la formulación del virus de Dengue inactivado de acuerdo con los métodos que se dan a conocer.

En ciertas modalidades, el uno o más virus de Dengue inactivados purificados son adsorbidos sobre una sal de aluminio antes de mezclarse con la solución para producir una preparación a granel previamente adsorbida del virus de Dengue inactivado. El virus de Dengue se combina en solución con una sal de aluminio y se le permite hacer contacto con las partículas de aluminio durante un tiempo que permita la adsorción del virus inactivado a las partículas de aluminio. Las sales de aluminio adecuadas incluyen hidróxido de aluminio, fosfato de aluminio, hidroxifosfato de aluminio, y sulfato de potasio y aluminio. Típicamente, cada virus seleccionado es independientemente adsorbido sobre el aluminio para permitir la optimización empírica de la proporción del virus:aluminio. En un ejemplo favorable, cada virus de Dengue seleccionado es individualmente adsorbido sobre hidróxido de aluminio para producir un monovolumen adsorbido en alum antes de la subsiguiente formulación con los otros componentes de la composición inmunogénica. De una manera alternativa, cada uno de los virus de Dengue seleccionados puede ser adsorbido sobre fosfato de aluminio u otra sal de aluminio farmacéuticamente aceptable. Si se desea, el virus de Dengue inactivado purificado se puede combinar en la proporción deseada, y entonces es adsorbido como una mezcla sobre la sal de aluminio seleccionada. De una manera alternativa, en lugar de la adsorción previa sobre una sal de aluminio, el virus de Dengue inactivado purificado se puede volver a suspender, como se describe a continuación, en

una solución que contenga la sal de aluminio seleccionada.

En el contexto de las formulaciones que se dan a conocer en la presente, la solución con la que se mezcla el virus de Dengue inactivado purificado (opcionalmente previamente adsorbido sobre una sal de aluminio) contiene un agente regulador del pH. Es decir, la solución es una solución regulada capaz de resistir los cambios en el pH que de otra manera podrían ser causados por la adición de otros componentes a la formulación, o a la preparación final de la composición inmunogénica para su administración, como se discute más adelante.

El virus de Dengue es sensible al pH ácido, y a un pH ácido, se pueden perder los epítomos inmunológicos importantes, disminuyendo la capacidad del antígeno del virus inactivado purificado para provocar una respuesta inmunitaria. El agente regulador del pH, por consiguiente, se selecciona de tal manera que se mantenga el pH en o cerca del neutro, o a un pH ligeramente básico. Para mejorar el pH final en algunas formulaciones, el agente regulador del pH se selecciona para promover un pH en la formulación inicial (por ejemplo, antes de la adición de ciertos componentes, tales como los adyuvantes, que pueden tener un pH ácido) que sea más alto que aquél deseado en la composición final administrada al sujeto. De conformidad con lo anterior, un agente regulador del pH (o la combinación de agentes) se selecciona para mantener el pH en o mayor a un pH de 6.4. Más preferiblemente, el agente regulador del pH se selecciona para mantener el pH en o mayor a un pH de 6.8; de una manera muy preferible, el agente regulador

del pH se selecciona para mantener el pH en o mayor al neutro, por ejemplo, en o cerca del pH fisiológico de 7.4, y en alguna instancia en o mayor a un pH de 7.5, tal como en o mayor a un pH de 8.0, o incluso un pH de 8.5.

Los agentes reguladores adecuados incluyen los agentes reguladores de carbonato, fosfato, citrato, lactato, gluconato y tartrato, así como agentes reguladores orgánicos más complejos. En ciertos ejemplos, el agente regulador del pH incluye un agente regulador de fosfato que contenga fosfato de sodio y/o fosfato de potasio. Típicamente, este agente regulador, o sistema, incluye tanto fosfato de sodio como fosfato de potasio en una proporción seleccionada de tal manera que se alcance el pH deseado. En otro ejemplo, el agente regulador del pH contiene Tris-(hidroxi-metil)-amino-metano, o "Tris", formulado para alcanzar el pH deseado. Los métodos para formular los reguladores hasta el pH deseado son bien conocidos por aquéllos con experiencia en la materia, y una
15 composición adecuada se puede determinar sin una indebida experimentación basándose en el pH deseado.

En las formulaciones de las preparaciones y composiciones inmunogénicas a granel que se dan a conocer en la presente, la solución que
20 contiene los virus de Dengue inactivados purificados también incluye un tensoactivo. Numerosos tensoactivos son conocidos en la materia, y se pueden utilizar en las formulaciones farmacéuticas. El tensoactivo, en el contexto de las formulaciones que se dan a conocer en la presente, se selecciona para conservar las propiedades inmunológicas (por ejemplo, conformación y
25 epítopos inmunológicos) del virus de Dengue inactivado purificado, mientras

que se aumenta la estabilidad de la formulación y se mejora la recuperación, por ejemplo, mediante la reducción de la adsorción y/o acumulación específica del virus.

Los tensoactivos son moléculas anfifílicas con una "cabeza" predominantemente hidrofílica y una "cola" hidrofóbica. Los tensoactivos se pueden clasificar de acuerdo con la composición de sus porciones de cabeza y cola. Basándose en las características de su porción de cabeza, los tensoactivos se pueden clasificar como: no iónicos (sin carga) o iónicos (cargados). Los tensoactivos iónicos se pueden dividir en aniónicos (negativamente cargados), catiónicos (positivamente cargados), y anfotéricos, por ejemplo, zwitteriónicos (dos grupos opuestamente cargados). Los tensoactivos también se pueden categorizar por la composición de su porción de cola. Los tensoactivos adecuados incluyen aquéllos con colas de hidrocarburo (por ejemplo, areno, alcano, alqueno, cicloalcano y alquino); colas de alquil-éter, colas etoxiladas (poli-óxido de etileno); y colas propoxiladas (poli-óxidos de propileno).

En ciertas modalidades, el tensoactivo seleccionado es un tensoactivo zwitteriónico. En una modalidad, el tensoactivo es un tensoactivo inyectable. En el contexto de las presentes formulaciones, una clase adecuada de tensoactivos incluye los tensoactivos de poloxámeros.

Los poloxámeros son copolímeros no iónicos de tres bloques (tribloque) compuestos de una cadena hidrofóbica central de polioxipropileno (poli-óxido de propileno) flanqueada por dos cadenas hidrofílicas de polioxietileno (poli-óxido

de etileno), como se ilustran esquemáticamente en la Figura 1. Los poloxámeros son también conocidos por el nombre comercial Pluronic^{MR}, y algunos de éstos se venden bajo el nombre comercial Lutrol^{MR} o Kolliphor^{MR}. Los tensoactivos de poloxámeros son en particular adecuados para las formulaciones en donde los virus de Dengue inactivados purificados no sean adsorbidos sobre una sal de aluminio.

En ciertas modalidades, el tensoactivo de poloxámero se selecciona a partir de un copolímero de polietilen-polipropilen-glicol que esté en forma sólida a temperatura ambiente, por ejemplo, con un peso molecular promedio de cuando menos aproximadamente 4,500 kD, y un peso molecular promedio de no más de aproximadamente 15,000 kD. Por ejemplo, el tensoactivo de poloxámero se puede seleccionar a partir del grupo de Pluronic^{MR} F108, Pluronic^{MR} F127, Pluronic^{MR} F188, Pluronic^{MR} F38, Pluronic^{MR} F68, Pluronic^{MR} F77, Pluronic^{MR} F87, Pluronic^{MR} F88, y Pluronic^{MR} F98. Diversos tensoactivos Pluronic^{MR} también se venden bajo el nombre comercial Lutrol^{MR} (ahora Kolliphor^{MR}). En una modalidad específica, la composición inmunogénica se formula con un copolímero de polietilen-polipropilen-glicol, designado como Pluronic^{MR} F 68 ó Lutrol^{MR} F 68 (Kolliphor^{MR} PI 88), el cual tiene un peso molecular promedio de 8,600 kD, con un peso molecular del polioxipropileno de 1,800 gramos/mol y un contenido de polioxietileno del 80 por ciento. De una manera alternativa, se pueden emplear los tensoactivos de poloxámeros que están en forma de pasta o en forma líquida a temperatura ambiente, por ejemplo, que tienen un peso molecular de cuando menos aproximadamente

1,000 kD, tales como Pluronic^{MR} L 10, Pluronic^{MR} L 101, Pluronic^{MR} L 121, Pluronic^{MR} L 31, Pluronic^{MR} L 35, Pluronic^{MR} L 43, Pluronic^{MR} L 44, Pluronic^{MR} L 61, Pluronic^{MR} L 62, Pluronic^{MR} L 64, Pluronic^{MR} L 81, Pluronic^{MR} L 92, Pluronic^{MR} P 103, Pluronic^{MR} P 104, Pluronic^{MR} P 105, Pluronic^{MR} P 123, Pluronic^{MR} P 65, Pluronic^{MR} P 84 ó Pluronic^{MR} P 85.

Otros ejemplos de los tensoactivos adecuados, en adición a los tensoactivos de poloxámeros, como se observa anteriormente, en el contexto de las formulaciones que se dan a conocer en la presente, incluyen los tensoactivos seleccionados a partir del grupo que consiste en un poloxámero, hidroxi-estearato de macrogol 15, un polisorbato, un octoxinol, un polidocanol, un polioxiestearato, un aceite de ricino de polioxilo, un N-octil-glucósido, y combinaciones de los mismos.

El tensoactivo se puede agregar a la formulación en una cantidad de cuando menos el 0.0001 por ciento y hasta el 1.0 por ciento. Por ejemplo, el tensoactivo se puede agregar en una cantidad de cuando menos el 0.0005 por ciento), y hasta el 0.5 por ciento, tal como entre el 0.001 y el 0.2 por ciento, por ejemplo, en una concentración del 0.0005 por ciento, o del 0.001 por ciento, o del 0.005 por ciento, o del 0.01 por ciento, o del 0.025 por ciento, o del 0.05 por ciento, o del 0.1 por ciento, o del 0.2 por ciento, o del 0.3 por ciento), o del 0.4 por ciento), o del 0.5 por ciento, o hasta del 1.0 por ciento (o cualquier cantidad que intervenga). Estas concentraciones se dan como peso/volumen en la formulación inicial. Se entenderá que, en las modalidades discutidas más adelante, cuando la composición se liofiliza y/o se liofiliza y se vuelve a

suspender, se pueden volver a calcular las cantidades precisas sobre una base de peso/peso (para las composiciones sólidas) y/o se pueden ajustar dependiendo de la concentración o del factor de dilución de la formulación final para administrarse a un sujeto.

Típicamente, la cantidad final se calcula para quedar dentro de la exposición diaria permisible (PDE). Por ejemplo, para el Pluronic^{MR} F68, la exposición diaria permisible (PDE) aceptada es de 150 microgramos por dosis inyectada. De conformidad con lo anterior, la concentración en la formulación final puede variar dependiendo del volumen para administrarse con el fin de alcanzar la exposición diaria permisible (PDE) aceptable.

En algunas modalidades, las formulaciones que se dan a conocer en la presente incluyen un componente farmacéuticamente aceptable adicional para modificar la tonicidad, viscosidad, estabilidad, homogeneidad o similares, de la solución.

Por ejemplo, la solución (y por consiguiente, la formulación) puede incluir una o más sales. Más comúnmente, la sal es cloruro de sodio. Sin embargo, también se pueden utilizar otras sales minerales y iones, por ejemplo, las sales de potasio, calcio, magnesio, manganeso, zinc, así como otras sales farmacéuticamente aceptables y iones. Las sales farmacéuticamente aceptables y su selección se discuten completamente, por ejemplo, en *Pharmaceutical Salts: Properties, Selection, and Use*, 2^a Edición Revisada, P. Heinrich Stahl (Editor), Camille G. Wermuth (Editor), Wiley, 2011.

En algunas modalidades, la solución contiene cuando menos un

excipiente o vehículo adicional. Por ejemplo, la solución (y por consiguiente, la formulación) puede incluir cuando menos un azúcar o poliol (o combinaciones de los mismos), incluyendo polioles de carbohidratos y no de carbohidratos, por ejemplo, azúcares y polioles formadores de cristal. El excipiente típicamente se selecciona de tal manera que se haga posible que el virus de Dengue inactivado sea almacenado sin una pérdida sustancial de los epítomos inmunológicamente importantes. Los ejemplos de los excipientes adecuados incluyen azúcares, alcoholes de azúcar, y derivados de carbohidratos.

Los carbohidratos incluyen, pero no se limitan a, monosacáridos, disacáridos, trisacáridos, oligosacáridos y sus alcoholes de azúcar correspondientes, compuestos de poli-hidroxilo, tales como derivados carbohidratos y carbohidratos químicamente modificados, copolímeros de almidón de hidroxietilo y azúcar. Los carbohidratos tanto naturales como
15 sintéticos son adecuados para usarse. Los carbohidratos sintéticos incluyen, pero no se limitan a, aquéllos que tienen el enlace glicosídico reemplazado por un enlace de tiol o carbono. Se pueden utilizar ambas formas D y L de los carbohidratos. El carbohidrato puede ser no reductor o reductor. Cuando se
20 utiliza un carbohidrato reductor, se prefiere la adición de los inhibidores de la reacción de Maillard.

Los carbohidratos reductores adecuados para usarse en la invención son aquéllos conocidos en la materia e incluyen, pero no se limitan a, glucosa, maltosa, lactosa, fructosa, galactosa, manosa, maltulosa y lactulosa. Los
25 carbohidratos no reductores incluyen, pero no se limitan a, glicósidos no

reductores de compuestos de poli-hidroxilo seleccionados a partir de alcoholes de azúcar y otros polialcoholes de cadena recta. Otros carbohidratos útiles incluyen rafinosa, estaquiosa, melezitosa, dextrano, sacarosa, celobiosa, manobiosa y alcoholes de azúcar. Los glicósidos de alcohol de azúcar son de preferencia mono-glicósidos, en particular los compuestos obtenidos mediante la reducción de los disacáridos, tales como lactosa, maltosa, lactulosa y maltulosa.

Típicamente, el excipiente se selecciona a partir del grupo de carbohidratos (o derivado de los mismos) incluyendo glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, ácido lactobiónico, sacarosa, maltosa, lactosa, glucosa, iso-maltosa, manitol, maltitol, lactitol, sorbitol, palatinit, trehalosa, rafinosa, estaquiosa, melezitosa, manosa o dextrano, o una combinación de los mismos. En ciertos ejemplos, el azúcar o el poliol formador de cristal se selecciona a partir del grupo que consiste en: sacarosa, trehalosa, manosa, manitol, rafinosa, lactitol, sorbitol y ácido lactobiónico, glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, maltosa, lactosa, iso-maltosa, maltitol, palatinit, estaquiosa, melezitosa, dextrano, o una combinación de los mismos. En una modalidad específica, el excipiente es sacarosa.

La concentración del azúcar o del poliol incluido en la solución puede ser de entre el 1 por ciento y el 50 por ciento en peso/volumen, tal como de entre el 1 y el 10 por ciento (por ejemplo, de entre el 1 y el 5 por ciento, de entre el 3 y el 7 por ciento, de entre el 5 y el 10 por ciento, o cualquier intervalo que intervenga), o de entre el 10 y el 15 por ciento), de entre el 15 y el 20 por

ciento), de entre el 20 y el 25 por ciento) o de entre el 25 y el 50 por ciento), más preferiblemente menor o igual al 5 por ciento, o menor o igual al 10 por ciento (peso/volumen).

De una manera alternativa, o en adición, el excipiente puede incluir un aminoácido, tal como glicina, alanina, arginina, lisina y glutamina, aunque se puede incluir cualquier aminoácido, o una combinación de aminoácidos, péptido, proteína hidrolizada, o proteína, tal como albúmina de suero.

Las composiciones de formulación de ejemplo se proporcionan en la Tabla 1.

	Regulador	pH (+/- 0.1)
	5mM Na/K ₂ PO ₄ , NaCl 50mM	7.6
15	5mM Na / K ₂ PO ₄ , NaCl 50mM, Poloxámero 188 al 0.1%, Sacarosa al 3%	7.6
	10mM Na/K ₂ PO ₄ , Poloxámero 188 al 0.1%, Sacarosa al 3%	7.6
20	5mM K/K ₂ PO ₄ , Citrato 10mM, Poloxámero 188 al 0.1% Sacarosa al 3%	7.6
	PBS, Citrato 125mM	7.6
25	Tris 5mM, Maleato 5mM, Poloxámero 188 al 0.1 %, Sacarosa	7.5

Regulador	pH (+/- 0.1)
al 3%	
Tris 5mM, NaCl 5mM, Poloxámero 188 al 0.1 %, Sacarosa al 3%	8.0
Tris 5mM, Maleato 5mM, NaCl 5mM, Poloxámero 188 al 0.1 %, Sacarosa al 3%	7.5
10mM Na/K ₂ PO ₄ , Poloxámero 188 al 0.1%, Sorbitol al 1%	7.6
10mM K/K ₂ PO ₄ , Histidina al 0.4%, Poloxámero 188 al 0.1%, Sorbitol al 1%	7.6

15

En una modalidad favorable, el regulador comprende Tris 5mM, NaCl 50 mM, opcionalmente con un tensoactivo, por ejemplo, Poloxámero 188 y un azúcar, por ejemplo, sacarosa. Sin embargo, se apreciará que los ejemplos de regulador proporcionados en la presente no se pretenden para limitar, ya sea mediante los componentes específicos, o por las combinaciones específicas proporcionadas como ejemplos.

20

Típicamente, la solución en donde los virus de Dengue inactivados purificados se formulan se prepara mediante la adición del diversos componentes para agua libre de endotoxina (por ejemplo, agua estéril). Por

25

ejemplo, la solución a la que los virus de Dengue inactivados purificados se agregan se puede preparar mediante la adición de agua libre de endotoxina: un azúcar formador de cristal o poliol; un agente regulador; una sal; y un tensoactivo. En una modalidad, los componentes se agregan en secuencia en el orden: un azúcar formador de cristal o poliol; un agente regulador; una sal; y un tensoactivo. Los componentes pueden ser estériles, y/o la solución se puede esterilizar, por ejemplo, mediante filtración y otros métodos convenientes. En el caso de que los virus inactivados purificados estén en una solución que contiene uno o más de los componentes para incluirse en la formulación final, la cantidad se puede ajustar para la concentración seleccionada de la preparación a granel final o la composición inmunogénica.

15 Los vehículos farmacéuticamente aceptables y excipientes adicionales también se pueden incluir en la formulación, estos vehículos y excipientes son bien conocidos en la materia, y se describen, por ejemplo, en Remington 's Pharmaceutical Sciences, by E.W. Martin, Mack Publishing Co., Easton PA, 5^{ta} Edición.

20 En ciertas modalidades, siguiendo la adición del virus de Dengue inactivado purificado a la solución que contiene el regulador y el tensoactivo (y opcionalmente, componentes adicionales) como se describe anteriormente, la composición inmunogénica formulada se almacena como un líquido, por ejemplo, a temperatura ambiente, de 0 a 4°C, o más adelante 0°C, tal como a o aproximadamente a -20°C, a o aproximadamente de -70 a -80°C.

25 De una manera alternativa, la composición formulada se seca, por

ejemplo, mediante liofilización para producir una composición seca o liofilizada. El secado (mediante la evaporación del solvente a partir de la formulación) se puede llevar a cabo mediante liofilización. Liofilización se lleva a cabo sobre una mezcla de solvente/soluto bajo vacío que dé como resultado la sublimación del solvente, y dejar detrás los solutos secos, incluyendo los virus de Dengue inactivados purificados, y otros componentes de la formulación. Cualquier presión menor de 100 μ bar es del tipo adecuada. Típicamente al vacío de cuando menos aproximadamente 500 mBar es suficiente para promover la evaporación eficiente de un solvente, y al vacío de cuando menos aproximadamente 6 mBar es suficiente para promover la sublimación suficiente de un solvente. Aunque la presión puede ser reducida además, haciéndola tener un pequeño sobre la velocidad de secado, y bajo condiciones de presión muy baja, se reduce la eficiencia de la sublimación. Aunque la remoción del solvente se puede llevar a cabo simplemente poniendo una muestra del líquido en una cámara al vacío, haciendo espuma o espumando, pueden dar como resultado pérdida de producto, así como una disminución en la homogeneidad o inmunogenicidad del producto. Para prevenir la formación de espuma o espumación, la composición inmunogénica formulada primero se puede congelar y se puede remover el solvente, entonces mediante la sublimación al vacío, es decir, mediante liofilización o secado por congelación. Un procedimiento de ejemplo se ilustra en el Ejemplo 3.

Por consiguiente, en ciertas modalidades, la divulgación proporciona preparaciones liofilizadas del virus de Dengue inactivado que contienen cuando

menos un virus de Dengue inactivado purificado y un tensoactivo, tal como los tensoactivos que se dieron a conocer anteriormente, por ejemplo, tensoactivos de poloxámeros, etc. En algunos casos la preparación liofilizada contiene una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio o fosfato de aluminio. Por ejemplo, uno o más de un virus de Dengue inactivado purificado puede ser adsorbido sobre la sal de aluminio. Las preparaciones liofilizadas también puede incluir cuando menos un componente que actúa como un agente regulador del pH y/o cuando menos uno de un azúcar formador de cristal y un poliol formador de cristal. Un experto ordinario en este campo reconocerá otras modalidades y alternativas basándose en las divulgaciones anteriores.

En las modalidades en donde la composición formulada se seca, la composición seca típicamente se vuelve a suspender en un solvente farmacéuticamente aceptable antes de la administración, por ejemplo, como un líquido inyectable. La solución a la que se administra el virus de Dengue inactivado purificado se selecciona para ser adecuada para la administración farmacéutica a un sujeto humano. Típicamente, la solución se selecciona para ser aceptable para su administración parenteral, por ejemplo, mediante administración intramuscular, subcutánea, transcutánea o intradérmica. Por ejemplo, la composición seca se puede volver a suspender en agua para inyecciones, por ejemplo, agua estéril sin endotoxinas. De una manera alternativa, el solvente puede ser una mezcla de solventes acuosos y orgánicos. En algunas modalidades, las composiciones inmunogénicas vueltas a suspender son isotónicas.

De una manera alternativa, si la composición inmunogénica vuelta a suspender no es isotónica, la tonicidad se puede ajustar, por ejemplo, mediante la adición de una sal u otro excipiente, a isotónico o cerca de isotónico antes de la administración. Se apreciará por aquéllos de una experiencia ordinaria en este campo que los volúmenes, antes y opcionalmente después de la liofilización, en donde sea relevante, se pueden seleccionar y se ajustan basándose en la conveniencia. Dependiendo de los volúmenes relativos, por ejemplo, de la composición inmunogénica formulada antes de la liofilización y siguiendo la vuelta a suspender, la composición final preparada para su administración puede ser en un volumen menor o mayor y, por consiguiente, puede ser más o menos concentrada que la formulación de ejemplo en la presente. Los ajustes en la concentración se pueden calcular fácilmente sin una experimentación indebida para la preferencia convenida.

15 Típicamente, la cantidad de virus en cada dosis de composición
inmunogénica se selecciona como una cantidad que induce una respuesta
inmunoprotectora (en seguida de una o más dosis) sin efectos secundarios
adversos significantes en el sujeto típico. La inmunoprotección en este contexto,
20 no necesariamente significa proteger completamente contra infección; significa
protección contra síntomas o enfermedad, en especial enfermedad severa
asociada con el virus. La cantidad de antígeno puede variar dependiendo de
cual inmunógeno específico se emplee. El contenido de antígeno se puede
medir en términos de microgramos de contenido de proteína total de un
25 antígeno de virus purificado o parcialmente purificado, o por métodos

inmunológicos, por ejemplo, ELISA, o por un método de inmunoprecipitación cuantitativo, tal como inmunodifusión radial. En términos generales, se espera que cada dosis humana comprenderá de 0.01 a 100 microgramos de virus inactivado, tal como cuando menos aproximadamente 0.1 microgramos (por ejemplo, 0.1, 0.2, 0.25, 0.3, 0.33, 0.4, ó 0.5 microgramos) a no más de aproximadamente 50 microgramos, por ejemplo, de aproximadamente 0.25 microgramos a aproximadamente 30 microgramos, tal como aproximadamente 0.25 microgramos, 0.33 microgramos, 0.5 microgramos, 1 microgramo, aproximadamente 2 microgramos, aproximadamente 2.5 microgramos, aproximadamente 3 microgramos, aproximadamente 4 microgramos, aproximadamente 5 microgramos, o aproximadamente 10 microgramos (o cualquier cantidad entre 0.1 y 10.0 microgramos) de cada serotipo del virus. Típicamente, una sola dosis humana de la composición inmunogénica contiene

15 no más de aproximadamente 100 microgramos, por ejemplo, no más de aproximadamente 90 microgramos, o no más de aproximadamente 80 microgramos, o no más de aproximadamente 75 microgramos, o no más de aproximadamente 70 microgramos, o no más de aproximadamente 60

20 microgramos, o no más de aproximadamente 50 microgramos, o no más de 40 microgramos, o no más de 30 microgramos, o no más de 20 microgramos, o no más de 10 microgramos (o cualquier cantidad entre 10 y 100 microgramos) de cada serotipo del virus. Por ejemplo, una sola dosis humana de la composición inmunogénica pueden incluir entre 0.10 y 10 microgramos, o entre 0.25 y 5

25 microgramos por dosis humana, o cualquier otro intervalo definido por los

parámetros del individuo citado anteriormente.

La cantidad utilizada en una composición inmunogénica se selecciona basándose en la población del sujeto (por ejemplo, infante). Una cantidad óptima para una composición particular puede acertarse mediante estudios convencionales que involucran la observación de los títulos del anticuerpo y otras respuestas en los sujetos. En seguida de la vacunación inicial, los sujetos pueden recibir una o más dosis adicionales después de un intervalo adecuado (por ejemplo, en aproximadamente 4 semanas). Típicamente la inmunoprotección puede resultar después de cuando menos dos dosis de un composición inmunogénica como se describe en la presente, y en algunas instancias resulta después de dos o tres o más dosis, suministradas después de los intervalos adecuados.

15 En algunas modalidades, la composición inmunogénica incluye cuando menos un componente o adyuvante inmunoestimulante. En algunas instancias, el adyuvante comprende una sal mineral, tal como una sal de aluminio (alum), por ejemplo, sulfato de potasio-aluminio, fosfato de aluminio o hidróxido de aluminio. En donde alum está presente, la cantidad es típicamente entre
20 aproximadamente 100 microgramos y 1 miligramo, tal como de aproximadamente 100 microgramos, o aproximadamente 200 microgramos a aproximadamente 750 microgramos, tal como aproximadamente 500 microgramos por dosis. Como se discute anteriormente, en las formulaciones en donde se emplea una sal de aluminio, los virus de Dengue inactivados
25 purificados se pueden pre-adsorber sobre la sal de aluminio antes de la

formulación en las composiciones que se dan a conocer en la presente. De una manera alternativa, la sal de aluminio se pueden incluir en el líquido, en donde la composición inmunogénica liofilizada se vuelve a suspender, o se agrega a la composición líquida. En adición a las sales de aluminio, también se pueden utilizar sales de calcio, por ejemplo, como adyuvantes particulares.

De una manera alternativa o en adición (por ejemplo, a una sal de aluminio), el líquido en donde la formulación seca se vuelve a suspender pueden incluir un componente inmunoestimulante. El componente inmunoestimulante también se puede agregar a una formulación líquida antes de la administración (por ejemplo, preparada en dos frascos y/o jeringas u otros contenedores, y se mezcla antes de la administración). Por ejemplo, cuando la composición inmunogénica se formula para administración intramuscular, se seleccionan favorablemente los adyuvantes incluyendo uno o más de 3D-MPL, escualeno (por ejemplo, QS21), los liposomas, y/o emulsiones de aceite y agua.

Un adyuvante adecuado para utilizarse en combinación con antígenos de virus de Dengue inactivado purificado es un derivado de lipopolisacárido de bacteria no tóxico. Un ejemplo de un derivado de lípido A no tóxico adecuado es el monofosforilo-lípido A, o más particularmente el monofosforilo-lípido A 3-desacilado (3D-MPL). El 3D-MPL es vendido bajo el nombre MPL por GlaxoSmithKline Biologicals N.A., y se refiere a través del documento como MPL ó 3D-MPL. Véase, por ejemplo, las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 4,436,727; 4,877,611; 4,866,034 y 4,912,094. El 3D-MPL primordialmente promueve respuestas de células CD4+T con un fenotipo

IFN- γ (Th1). El 3D-MPL se puede producir de acuerdo con los métodos que se dan a conocer en la Patente de Gran Bretaña Número GB2220211 A. Químicamente es una mezcla de monofosforilo-lípido A 2-desacilado con 3, 4, 5 ó 6 cadenas aciladas. En las composiciones de la presente invención se pueden utilizar partículas pequeñas de 3D-MPL. Las partículas pequeñas de 3D-MPL tiene un tamaño de partículas de tal manera que se pueden filtrar de manera estéril a través de un filtro de 0.22 micras. Las preparaciones se describen en la Publicación Internacional Número WO94/21292.

Un lipopolisacárido, tal como 3D-MPL, se puede utilizar en cantidades de entre 1 y 50 microgramos, por dosis humana de la composición inmunogénica. El 3D-MPL se puede utilizar en un nivel de aproximadamente 25 microgramos, por ejemplo, entre 20 y 30 microgramos, de una manera adecuada entre 21 y 29 microgramos o entre 22 y 28 microgramos o entre 23 y 27 microgramos o
15 entre 24 y 26 microgramos, ó 25 microgramos. En otra modalidad, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende el 3D-MPL en un nivel de aproximadamente 10 microgramos, por ejemplo, entre 5 y 15 microgramos, de una manera adecuada entre 6 y 14 microgramos, por ejemplo, entre 7 y 13
20 microgramos o entre 8 y 12 microgramos o entre 9 y 11 microgramos, ó 10 microgramos. En una modalidad adicional, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende el 3D-MPL en un nivel de aproximadamente 5 microgramos, por ejemplo, entre 1 y 9 microgramos, o entre 2 y 8 microgramos o de una manera adecuada entre 3 y 7 microgramos ó 4 y 6 microgramos, ó 5
25 microgramos.

En otras modalidades, el lipopolisacárido puede ser un disacárido de glucosamina β (1-6), como se describe en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,005,099 y la Patente Europea Número EP 0 729 473 B1 . Un experto en la materia sería fácilmente capaz de producir diversos lipopolisacáridos, tales como el 3D-MPL, basándose en las enseñanzas de estas referencias. Sin embargo, cada una de estas referencias se incorpora a la presente como referencia. En adición a los inmunoestimulantes anteriormente mencionados (que son similares en estructura al LPS o al MPL o al 3D-MPL), los derivados de monosacáridos y disacáridos acilados que son una subporción de la estructura anterior del MPL también son adyuvantes adecuados. En otras modalidades, el adyuvante es un derivado sintético de lípido A, algunos de los cuales se describen como agonistas de TLR-4, e incluyen, pero no se limitan a: OM174 (2-desoxi-6-o-[2-desoxi-2-[(R)-3-dodecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-4-o-fosfono- β -D-glucopiranosil]-2-[(R)-3-hidroxi-tetradecanoil-amino]- α -D-glucopiranosil-dihidrogen-fosfato), (Publicación Internacional Número WO 95/14026); OM 294 DP (3S,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-4-oxo-5-aza-9(R)-[(R)-3-hidroxi-tetradecanoil-amino]-decan-1,10-diol,1,10-bis-(dihidrogen-fosfato) (Publicaciones Internacionales Números WO 99/64301 y WO 00/0462); y OM 197 MP-Ac DP 10-(6-amino-hexanoato) de (3S-,9R)-3-[(R)-dodecanoiloxi-tetradecanoil-amino]-4-oxo-5-aza-9-[(R)-3-hidroxitetradecanoil-amino]-decano-1,10-diol,1-dihidrogen-fosfato (Publicación Internacional Número WO 01/46127).

Otros componentes inmunoestimulantes que se pueden utilizar en las

composiciones inmunogénicas con los virus de Dengue inactivados purificados, por ejemplo, por sí mismos o en combinación con 3D-MPL, u otro adyuvante descrito en la presente, son las saponinas, tales como QS21.

Las saponinas se enseñan en: Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996. *A review the biological and pharmacological activities of saponins. Phytomedicine*, Volumen 2 páginas 363-386). Las saponinas son glicósidos esteroideos o de triterpeno ampliamente distribuidos en los reinos vegetal y de animales marinos. Se observa que las saponinas forman soluciones coloidales en agua, las cuales forman espuma cuando se agitan, y para precipitar el colesterol. Cuando las saponinas están cerca de las membranas celulares, crean estructuras en forma de poros en la membrana, las cuales hacen que explote la membrana. La hemólisis de los eritrocitos es un ejemplo de este fenómeno, que es una propiedad de ciertas saponinas, pero no de todas.

15 Las saponinas son conocidas como adyuvantes en vacunas para la administración sistémica. La actividad adyuvante y hemolítica de las saponinas individuales se ha estudiado extensamente en la materia (Lacaille-Dubois y Wagner, *supra*). Por ejemplo, Quil A (derivado de la corteza del árbol sudamericano Quillaja Saponaria Molina) y las fracciones del mismo, se
20 describen en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número US 5,057,540 y "Saponins as vaccine adjuvants", Kensil, C. R., Crit Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1-55; y Patente Europea Número EP 0 362 279 B1. Las estructuras en partículas, denominadas como Complejos
25 Inmunoestimulantes (ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A, son

hemolíticas, y se han utilizado en la elaboración de vacunas (Morein, B., Patente Europea Número EP 0 109 942 B1; y Publicaciones Internacionales Números WO 96/11711 y WO 96/33739). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones de Quil A purificadas mediante HPLC) se han descrito como potentes adyuvantes sistémicos, y el método de su producción se da a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,057, 540 y en la Patente Europea Número EP 0 362 279 B1, las cuales se incorporan a la presente como referencia. Otras saponinas que se han utilizado en los estudios de vacunación sistémica incluyen aquéllas derivadas a partir de otras especies de plantas, tales como Gypsophila y Saponaria (Bomford y colaboradores, Vaccine, 10(9): 572-577, 1992).

15 QS21 es una fracción no tóxica purificada mediante HPLC derivada a partir de la corteza de Quillaja Saponaria Molina. Un método para producir QS21 se da a conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,057,540. Las formulaciones adyuvantes no reactogénicas que
20 contienen QS21 se describen en la Publicación Internacional Número WO 96/33739. Las referencias anteriormente mencionadas se incorporan como referencia a la presente. Esta saponina inmunológicamente activa, tal como QS21, se puede utilizar en cantidades de entre 1 y 50 microgramos, por dosis humana de la composición inmunogénica. Convenientemente, el QS21 se utiliza en un nivel de aproximadamente 25 microgramos, por ejemplo, de entre 20 y 30 microgramos, de una manera adecuada de entre 21 y 29 microgramos,
25 o de entre 22 y 28 microgramos, o de entre 23 y 27 microgramos, o de entre 24

y 26 microgramos, o de 25 microgramos. En otra modalidad, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende el QS21 en un nivel de aproximadamente 10 micro-gramos, por ejemplo, de entre 5 y 15 microgramos, de una manera adecuada de entre 6 y 14 microgramos, por ejemplo, de entre 7 y 13 microgramos, o de entre 8 y 12 microgramos, o de entre 9 y 11 microgramos, o de 10 microgramos. En una modalidad adicional, la dosis humana de la composición inmunogénica comprende el QS21 en un nivel de aproximadamente 5 microgramos, por ejemplo, de entre 1 y 9 microgramos, o de entre 2 y 8 microgramos, o de una manera adecuada de entre 3 y 7 microgramos, o de entre 4 y 6 microgramos, o de 5 microgramos. Se ha demostrado que estas formulaciones que comprenden QS21 y colesterol son adyuvantes estimulantes de Th1 de éxito cuando se formulan junto con un antígeno. Por consiguiente, por ejemplo, los virus de Dengue inactivados
15 purificados se pueden emplear favorablemente en las composiciones inmunogénicas con un adyuvante que comprenda una combinación de QS21 y colesterol.

Otros ligandos de TLR4 que se pueden utilizar son fosfatos de alquil-glucosaminida (AGPs), tales como aquéllos que se dan a conocer en la
20 Publicación Internacional Número WO 98/50399 o en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 6,303,347 (también se dan a conocer procesos para la preparación de AGPs), de una manera adecuada RC527 ó RC529 ó las sales farmacéuticamente aceptables de AGPs, como se dan a
25 conocer en la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número

6,764,840.

Algunos AGPs son agonistas de TLR4, y algunos son antagonistas de TLR4. Se cree que ambos son útiles como adyuvantes.

Otros ligandos de TLR-4 adecuados, capaces de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-4 (Sabroe y colaboradores, JI 2003 páginas 1630-5) son, por ejemplo, los lipopolisacáridos a partir de las bacterias Gram-negativas y sus derivados, o fragmentos de los mismos, en particular un derivado no tóxico de lipopolisacárido (LPS) (tal como 3D-MPL). Otros agonistas de TLR adecuados son: proteína de choque por calor (HSP) 10, 60, 65, 70, 75 ó 90; Proteína A tensoactiva, oligosacáridos de hialuronano, fragmentos de sulfato de heparano, fragmentos de fibronectina, péptidos de fibrinógeno, y b-defensina-2, y dipéptido de muramilo (MDP). En una modalidad, el agonista de TLR es proteína de choque por calor (HSP) 60, 70 ó 90. Otros

15 ligandos de TLR-4 adecuados son como se describen en las Publicaciones Internacionales Números WO 2003/011223 y WO 2003/099195, tales como el compuesto I, el compuesto II y el compuesto III que se dan a conocer en las páginas 4-5 de la Publicación Internacional Número WO2003/011223 ó en las

20 páginas 3-4 de la Publicación Internacional Número WO2003/099195, y en particular los compuestos que se dan a conocer en la Publicación Internacional Número WO2003/011223 como ER803022, ER803058, ER803732, ER804053, ER804057, ER804058, ER804059, ER804442, ER804680, y ER804764. Por ejemplo, un ligando de TLR-4 adecuado es ER804057.

25 Los agonistas de TLR adicionales también son útiles como adyuvantes.

El término "agonista de TLR" se refiere a un agente que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de una senda de señalización de TLR, ya sea como un ligando directo o bien indirectamente a través de la generación de ligandos endógenos o exógenos. Estos agonistas de TLR naturales o sintéticos se pueden utilizar como adyuvantes alternativos o adicionales. Se proporciona una breve reseña de la función de los TLRs como receptores adyuvantes en Kaisho y Akira, *Biochimica et Biophysica Acta* 1589: 1-13, 2002. Estos adyuvantes potenciales incluyen, pero no se limitan a, los agonistas para TLR2, TLR3, TLR7, TLR8 y TLR9. De conformidad con lo anterior, en una modalidad, el adyuvante y la composición inmunogénica comprenden además un adyuvante que se selecciona a partir del grupo que consiste en: un agonista de TLR-1, un agonista de TLR-2, un agonista de TLR-3, un agonista de TLR-4, un agonista de TLR-5, un agonista de TLR-6, un agonista de TLR-7, un agonista de TLR-8, un agonista de TLR-9, o una combinación de los mismos.

En una modalidad de la presente invención, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-1. De una manera adecuada, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-1, se selecciona a partir de: lipopéptidos (LPs) triacilados; modulina soluble en fenol; lipopéptidos (LPs) de *Mycobacteria tuberculosis*; S-(2,3-bis-(palmitoiloxi)(2-RS)-propil)-N-palmitoil-(R)-Cys-(S)-Ser-(S)-Lys(4)-OH, lipopéptidos (LPs) de triclórhidrato (Pam3Cys) que imitan el término amino acetilado de una lipoproteína bacteriana, y OspA LP a partir de *Borrelia burgdorferi*.

En una modalidad alternativa, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-2. De una manera adecuada, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-2 es uno o más de una lipoproteína, un peptidoglicano, un lipopéptido bacteriano a partir de *M tuberculosis*, *B burgdorferi* o *T pallidum*; peptidoglicanos a partir de las especies que incluyen *Staphylococcus aureus*; ácidos lipoteicoicos, ácidos manurónicos porinas de *Neisseria*, fimbrias bacterianas, factores de virulencia de *Yersina*, viriones de CMV, hemaglutinina de sarampión, y zimosano a partir de levadura.

En una modalidad alternativa, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-3. De una manera adecuada, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-3 es ARN de doble cadena (dsARN), o ácido poli-inosínico-policitidílico (Poli-IC), un patrón de ácido nucleico molecular asociado con
15 infección viral.

En una modalidad alternativa, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-5. De una manera adecuada, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización
20 a través de TLR-5 es flagelina bacteriana.

En una modalidad alternativa, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-6. De una manera adecuada, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización
25 a través de TLR-6 es lipoproteína micobacteriana, LP di-acilado, y modulina

soluble en fenol. Los agonistas de TLR6 adicionales se describen en la Publicación Internacional Número WO 2003/043572.

En una modalidad alternativa, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-7. De una manera adecuada, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-7 es un ARN de una sola cadena (ssARN), loxoribina, un análogo de guanosina en las posiciones N7 y C8, o un compuesto de imidazoquinolina, o un derivado del mismo. En una modalidad, el agonista de TLR es imiquimod. Otros agonistas de TLR7 se describen en la Publicación Internacional Número WO 2002/085905.

En una modalidad alternativa, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-8. De una manera adecuada, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-8 es un ARN de una sola cadena (ssARN), una molécula de imidazoquinolina con actividad antiviral, por ejemplo, resiquimod (R848); el resiquimod también es capaz de ser reconocido por el TLR-7. Otros agonistas de TLR-8 que se pueden utilizar incluyen aquéllos descritos en la Publicación Internacional Número WO 2004/071459.

En una modalidad alternativa, se utiliza un agonista de TLR que es capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-9. En una modalidad, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización a través de TLR-9 es HSP90. De una manera alternativa, el agonista de TLR capaz de provocar una respuesta de señalización a través de

TLR-9 es ADN bacteriano o viral, ADN que contiene nucleótidos de CpG no metilados, en contextos de secuencia particulares conocidos como motivos CpG. Los oligonucleótidos que contienen CpG inducen una respuesta predominantemente de Th1. Estos oligonucleótidos son bien conocidos y se describen, por ejemplo, en la Publicación Internacional Número WO 96/02555, en la Publicación Internacional Número WO 99/33488, y en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 6,008,200 y 5,856,462. De una manera adecuada, los nucleótidos de CpG son oligonucleótidos de CpG. Los oligonucleótidos adecuados para utilizarse en las composiciones inmunogénicas de la presente invención son oligonucleótidos que contienen CpG, los cuales opcionalmente contienen dos o más motivos CpG de dinucleótido separados por cuando menos tres, de una manera adecuada por cuando menos seis o más nucleótidos. Un motivo CpG es un nucleótido de Citosina, seguido por un nucleótido de Guanina. Los oligonucleótidos de CpG de la presente invención son típicamente desoxinucleótidos. En una modalidad específica, el internucleótido en el oligonucleótido es un enlace de fosforoditioato, o de una manera adecuada un enlace de fosforotioato, aunque los enlaces de fosfodiéster y de otros internucleótidos están dentro del alcance de la invención. Dentro del alcance de la invención, también se incluyen oligonucleótidos con enlaces internucleótidos mixtos. Los métodos para la producción de oligonucleótidos de fosforotioato o de fosforoditioato se describen en las Patentes de los Estados Unidos de Norteamérica Números 5,666,153 y 5,278,302 y en la Publicación Internacional Número WO 95/26204.

Otra clase de adyuvantes para utilizarse en las formulaciones con virus de Dengue inactivados purificados incluye las composiciones inmunoestimulantes basadas en OMP. Las composiciones inmunoestimulantes basadas en OMP son en particular adecuadas como adyuvantes mucosales, por ejemplo, para la administración intranasal. Las composiciones inmunoestimulantes basadas en OMP son un género de preparaciones de proteínas de membrana externa (OMPs, incluyendo algunas porinas) a partir de bacterias Gram-negativas, tales como, pero no limitándose a, las especies de *Neisseria* (véase, por ejemplo, Lowell y colaboradores, J. Exp. Med. 167: 658, 1988; Lowell y colaboradores, Science 240: 800, 1988; Lynch y colaboradores, Biophys. J. 45: 104, 1984; Lowell, en "New Generation Vaccines", 2ª Edición, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, Basil, Hong Kong, página 193, 1997; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,726,292; Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 4,707,543), las cuales son útiles como un vehículo o en composiciones para inmunógenos, tales como antígenos bacterianos o virales. Algunas composiciones inmunoestimulantes basadas en OMP pueden ser referidas como "Proteasomas", los cuales son hidrofóbicos y seguros para el uso humano.

20

Proteasomas tienen la capacidad para auto-ensamblarse en racimos de OMP de vesícula o en forma de vesícula de aproximadamente 20 nanómetros a aproximadamente 800 nanómetros, y para incorporar de una manera no covalente, coordinar, asociarse (por ejemplo, electrostáticamente o hidrofóticamente), o de otra manera cooperar con los antígenos de proteína

25

(Ags), en particular los antígenos que tienen una fracción hidrofóbica. Cualquier método de preparación que dé como resultado el componente de proteína de membrana externa en forma vesicular o de tipo vesícula, incluyendo las estructuras membranosas multi-moleculares o las composiciones de OMP de tipo globular fundidas de una o más OMPs, se incluye dentro de la definición de Proteasoma. Los proteasomas se pueden preparar, por ejemplo, como se describe en la técnica (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,726,292 ó la Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 5,985,284). Los proteasomas también pueden contener un lipopolisacárido o lipo-oligosacárido (LPS o LOS, respectivamente) endógeno que se origine a partir de las bacterias utilizadas para producir las porinas de OMP (por ejemplo, las especies de *Neisseria*), que en términos generales, serán menos del 2 por ciento de la preparación de OMP total.

15 Los proteasomas se componen primordialmente de proteínas de membrana externa (OMPs) químicamente extraídas a partir de *Neisseria meningitides* (en su mayor parte las porinas A y B, así como la OMP clase 4), mantenidas en solución mediante detergente (Lowell GH. Proteosomes for
20 Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. En: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, Editores, New Generation Vaccines. Nueva York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206). Los proteasomas se pueden formular con una variedad de antígenos, tales como las proteínas purificadas o recombinantes derivadas a partir de las fuentes virales, incluyendo los polipéptidos PreF que se
25 dan a conocer en la presente, por ejemplo, mediante los procesos de

diafiltración o de diálisis tradicional. La remoción gradual del detergente permite la formación de complejos hidrofóbicos en partículas de aproximadamente 100 a 200 nanómetros de diámetro (Lowell GH. Proteosomes for Improved Nasal, Oral, or Injectable Vaccines. En: Levine MM, Woodrow GC, Kaper JB, Cobon GS, Editores, New Generation Vaccines. Nueva York: Marcel Dekker, Inc. 1997; 193-206).

"Proteasoma: LPS o protolina", como se utiliza en la presente, se refiere a las preparaciones de proteasomas mezclados, por ejemplo, mediante la adición exógena, con cuando menos una clase de lipopolisacáridos para proporcionar una composición de OMP-LPS (la cual puede funcionar como un composición inmunoestimulante). Por consiguiente, la composición de OMP-LPS puede estar comprendida de dos de los componentes básicos de Protolina, los cuales incluyen: (1) una preparación de proteína de membrana externa de Proteasomas (por ejemplo, Projuvant) preparada a partir de bacterias Gram-negativas, tales como *Neisseria meningitidis*, y (2) una preparación de uno o más liposacáridos. Un lipo-oligosacárido puede ser endógeno (por ejemplo, contenido naturalmente con la preparación de proteasoma OMP), se puede mezclar o combinar con una preparación de OMP a partir de un lipo-oligosacárido exógenamente preparado (por ejemplo, preparado a partir de un cultivo o microorganismo diferente de la preparación de OMP), o puede ser una combinación de los mismos. Este LPS exógenamente agregado puede ser a partir de las mismas bacterias Gram-negativas a partir de las cuales se hizo la preparación de OMP o a partir de una bacteria Gram-negativa diferente.

También se debe entender que la Protolina incluye opcionalmente lípidos, glicolípidos, glicoproteínas, moléculas pequeñas, o similares, y combinaciones de los mismos. La Protolina se puede preparar, por ejemplo, como se describe en Publicación de Solicitud de Patente de los Estados Unidos de Norteamérica Número 2003/0044425.

También se pueden utilizar combinaciones de diferentes adyuvantes, tales como aquéllos mencionados anteriormente en la presente, en las composiciones con virus de Dengue inactivados purificados. Por ejemplo, como ya se observó, el QS21 se puede formular junto con 3D-MPL. La proporción de QS21:3D-MPL típicamente será del orden de 1:10 a 10:1; tal como de 1:5 a 5:1, y con frecuencia sustancialmente de 1:1. Típicamente, la proporción está en el intervalo de 2.5:1 a 1:1 del 3D-MPL al QS21. Opcionalmente, esta combinación puede estar en la forma de un liposoma.

15 Otra formulación adyuvante de combinación incluye 3D-MPL y una sal de aluminio, tal como hidróxido de aluminio. Cuando se formula en combinación, esta combinación puede mejorar una respuesta inmunitaria de Th1 específica del antígeno.

20 En algunas modalidades, el adyuvante incluye una emulsión de aceite y agua, por ejemplo, una emulsión de aceite en agua. Un ejemplo de una emulsión de aceite en agua comprende un aceite metabolizable, tal como escualeno, y un tensoactivo, tal como trioleato de sorbitán (Span 85^{MR}) o mono-oleato de sorbitán de polioxietileno (Tween 80^{MR}), o una combinación de los
25 mismos, en un vehículo acuoso. El vehículo acuoso puede ser, por ejemplo,

suero regulado con fosfato. En ciertas modalidades, la emulsión de aceite en agua no contiene ningún inmunoestimulante adicional (en particular no contiene un derivado de lípido A no tóxico, tal como 3D-MPL, o una saponina, tal como QS21). En ciertas modalidades, la emulsión de aceite en agua incluye un tocol, tal como un tocoferol, por ejemplo, alfa-tocoferol. Adicionalmente, la emulsión de aceite en agua puede contener lecitina y/o tricaprilina.

En otra modalidad de la invención, se proporciona una composición de vacuna que comprende un antígeno o una composición de antígeno y una composición adyuvante, la cual comprende una emulsión de un aceite en agua y opcionalmente uno o más inmunoestimulantes adicionales, en donde esta emulsión de aceite en agua comprende de 0.5 a 10 miligramos de aceite metabolizable (de una manera adecuada escualeno), de 0.4 a 4 miligramos de un agente emulsionante, y opcionalmente de 0.5 a 11 miligramos de tocol (de una manera adecuada un tocoferol, tal como alfa-tocoferol).

En una modalidad específica, la formulación adyuvante incluye 3D-MPL preparado en la forma de una emulsión, tal como una emulsión de un aceite en agua. En algunos casos, la emulsión tiene un tamaño de partícula pequeño de menos de 0.2 micras de diámetro, como se da a conocer en la Publicación Internacional Número WO 94/21292. Por ejemplo, las partículas de 3D-MPL pueden ser suficientemente pequeñas para poderse filtrar para esterilizarse a través de una membrana de 0.22 micras (como se describe en la Patente Europea Número 0 689 454). De una manera alternativa, el 3D-MPL se puede preparar en una formulación liposomal. Opcionalmente, el adyuvante que

contiene 3D-MPL (o un derivado del mismo) también incluye un componente inmunoestimulante adicional.

El adyuvante se selecciona de tal manera que sea seguro y efectivo en la población a la que se administre la composición inmunogénica. Para las poblaciones adultas y ancianas, las formulaciones típicamente incluyen más de un componente adyuvante que lo que se encuentra típicamente en una formulación para bebés. Cuando se formula una composición inmunogénica con un virus de Dengue inactivado purificado para su administración a un bebé, la dosificación de adyuvante se determina de tal manera que sea efectiva y relativamente no reactogénica en un sujeto bebé. En términos generales, la dosificación del adyuvante en una formulación para bebés es más baja (por ejemplo, la dosis puede ser una fracción de la dosis proporcionada en una formulación para administrarse a adultos) que aquella utilizada en las formulaciones diseñadas para su administración a adultos (por ejemplo, adultos de más de 65 años de edad). Por ejemplo, la cantidad de 3D-MPL está típicamente en el intervalo de 1 microgramo a 200 microgramos, tal como de 10 a 100 microgramos, o de 10 microgramos a 50 microgramos por dosis. Una dosis para bebés está típicamente en el extremo inferior de este intervalo, por ejemplo, de aproximadamente 1 microgramo a aproximadamente 50 microgramos, tal como de aproximadamente 2 microgramos, o de aproximadamente 5 microgramos, o de aproximadamente 10 microgramos, a aproximadamente 25 microgramos, o a aproximadamente 50 microgramos. Típicamente, cuando se utiliza el QS21 en la formulación, los intervalos son

comparables (y están de acuerdo con las proporciones indicadas anteriormente). En el caso de una emulsión de aceite y agua (por ejemplo, una emulsión de un aceite en agua), la dosis de adyuvante proporcionada a un niño o a un bebé puede ser una fracción de la dosis administrada a un sujeto adulto.

Por consiguiente, la composición inmunogénica formulada (incluyendo cualquier adyuvante) es adecuada para su administración a un sujeto humano, y tendrá las propiedades inmunogénicas deseadas en combinación con una seguridad y reactogenicidad aceptables. Típicamente, la composición inmunogénica formulada se formula en una cantidad de una sola dosis de cuando menos 0.05 mililitros, y no más de 2 mililitros, tal como entre 0.5 y 1.5 mililitros. Por ejemplo, una sola dosis puede estar en la cantidad de entre 0.5 y 0.5 mililitros, o de entre 0.1 y 2 mililitros, o de entre 0.5 y 1.5 mililitros, tal como en la cantidad de 0.05 mililitros, 0.06 mililitros, 0.07 mililitros, 0.075 mililitros, 0.08 mililitros, 0.09 mililitros, 0.1 mililitros, 0.2 mililitros, 0.25 mililitros, 0.3 mililitros, 0.33 mililitros, 0.4 mililitros, 0.5 mililitros, 0.6 mililitros, 0.66 mililitros, 0.7 mililitros, 0.75 mililitros, 0.8 mililitros, 0.9 mililitros, 1.0 mililitro, 1.25 mililitros, 1.33 mililitros, 1.5 mililitros ó 2 mililitros, o cualquier volumen que intervenga.

Aunque la composición se puede administrar mediante una variedad de diferentes vías, más comúnmente, las composiciones inmunogénicas se suministran mediante una vía de administración intramuscular, subcutánea o intradérmica. En términos generales, la vacuna se puede administrar subcutáneamente, intradérmicamente, o intramuscularmente en una dosis efectiva para la producción del anticuerpo neutralizante y la protección. Las

vacunas se administran de una manera compatible con la formulación de la dosificación, y en una cantidad que sea profilácticamente y/o terapéuticamente efectiva. La cantidad para administrarse, el cual está en general en el intervalo de 0.05 a 100 microgramos de cada cepa del virus inactivado por dosis, depende del sujeto que se vaya a tratar, de la capacidad del sistema inmunológico del sujeto para sintetizar anticuerpos, y del grado de protección deseado. Las cantidades precisas de la vacuna para administrarse pueden depender del juicio del practicante, y pueden ser peculiares para cada sujeto.

La vacuna se puede dar en un programa de una sola dosis, o de preferencia en un programa de múltiples dosis, en donde un curso primario de vacunación puede ser con 1 a 10 dosis separadas, seguidas por otras dosis dadas en los siguientes intervalos de tiempo requeridos para mantener y/o reforzar la respuesta inmunitaria, por ejemplo, a los 1 a 4 meses para una
15 segunda dosis, y si es necesario, una dosis subsiguiente después de varios meses o años. El régimen de dosificación también, cuando menos en parte, será determinado por la necesidad del individuo y será dependiente del juicio del practicante. Los ejemplos de los programas de inmunización adecuados
20 incluyen: una primera dosis, seguida por una segunda dosis entre 7 días y 6 meses, y una tercera dosis opcional entre 1 mes y dos años después de la inmunización inicial, u otros programas suficientes para provocar titulaciones de anticuerpos neutralizantes del virus que se espera que confieran inmunidad protectora, por ejemplo, seleccionados para corresponder a un programa de
25 vacunación pediátrica establecido. Se puede esperar razonablemente la

generación de inmunidad protectora contra el Dengue con la vacuna del virus inactivado después de un curso primario de inmunización consistente en 1 a 3 inoculaciones. Éstas podrían ser complementadas por refuerzos a intervalos (por ejemplo, cada dos años) diseñados para mantener un nivel de inmunidad protectora satisfactorio.

Los siguientes ejemplos se proporcionan para ilustrar ciertas características y/o modalidades particulares. Estos ejemplos no deben interpretarse para limitar la invención a las características o modalidades particulares descritas. Será apreciado por aquéllos con experiencia en la materia que las cantidades, por ejemplo, los volúmenes, se proporcionan como ejemplos solamente, y que la escala puede ser modificada (ya sea incrementada o disminuida) a opción del practicante. De una manera similar, se pretende que los componentes utilizados en la purificación, por ejemplo, los
15 filtros, las columnas, de ninguna manera sean limitantes o exclusionarios, y pueden ser sustituidos por otros componentes para lograr el mismo propósito a discreción del practicante.

EJEMPLOS

Ejemplo 1: Proceso de purificación para producir el virus de Dengue inactivado 20 purificado

El virus de Dengue se hace crecer en células Vero y se purifica esencialmente como se describe en la Solicitud Internacional Número WO 2010/094663. Por ejemplo, el virus de Dengue se hace crecer en células Vero,
25 por ejemplo, en un medio libre de animales. Típicamente, las células se

mantienen en una fase de precultivo estacionario (por ejemplo, en matraces T o en una fábrica de células), en un medio libre de animales (AF), tal como el medio VPSFM comercialmente disponible de Invitrogen. Las células entonces se expanden en un bio-reactor, típicamente unidas a microvehículos (tales como Cytodex 1), y se alimentan mediante cualquier modo de perfusión o por lotes. Una vez que las células han alcanzado la densidad adecuada, las células se infectan a la multiplicidad de infección (MOI) adecuada (por ejemplo, de 0.01 a 0.1, por ejemplo, de 0.05) con el virus, ya sea en el medio que contiene suero (por ejemplo, al 1.5 por ciento) o bien el medio AF. Cuando se emplea el medio que contiene suero, después de una fase de infección inicial (típicamente de aproximadamente 2 días), el medio es típicamente intercambiado hasta el medio AF. Opcionalmente, el medio AF es inicialmente o periódicamente complementado con glucosa, aminoácidos, o similares.

15 Después de un período adecuado para el crecimiento viral, por ejemplo, entre un mínimo de 6 y 8 días, se cosecha el virus a partir de las células. Opcionalmente, el virus se puede cosechar crecientemente a intervalos (por ejemplo, a intervalos de 2 días) empezando aproximadamente a los 6 días
20 después de la infección.

25 En la Figura 2A se ilustra esquemáticamente un proceso de purificación de ejemplo. En la Figura 2B se ilustra esquemáticamente un proceso de purificación modificado. Aunque es esencialmente similar al proceso de la Figura 2A, el proceso incluye las siguientes modificaciones. En seguida de la inactivación con formaldehído, se elimina el paso de neutralizar la formalina

libre en el volumen mediante la adición de bisulfito de sodio. La eliminación de la neutralización del bisulfito de sodio aumenta de una manera significativa el rendimiento en los siguientes pasos de filtración. La formalina libre se elimina mediante un paso de diafiltración.

En las Figuras 2C y 2D se ilustra un proceso de purificación alternativo. En seguida de la cosecha, el medio que contiene el virus se aclara, típicamente a través de una serie de tamaños de poros decrecientes (por ejemplo, de 8 micras, 0.6 micras, 0.45 micras, 0.2 micras). La suspensión del virus entonces se concentra y el medio se intercambia por regulador, por ejemplo, mediante ultrafiltración y diafiltración, seguidas por una filtración adicional y cromatografía de exclusión de tamaños (SEC) utilizando, por ejemplo, resinas Sephacryl S-400HR o Sepharose 4 FF. Opcionalmente, antes del procesamiento adicional, la suspensión de virus aclarada se inactiva mediante su exposición a irradiación ultravioleta (UV) (entre 100 y 500 J/m, por ejemplo, 200 J/m), ya sea antes o después del paso de concentración. Opcionalmente, el paso de cromatografía de exclusión de tamaños puede ser seguido por uno o más pasos, por ejemplo, cromatografía de membrana Sartobind-Q (en el modo negativo), y filtración para remover el ADN residual. En general, se prefiere que el ADN residual se reduzca hasta menos de o igual a 100 picogramos de ADN por microgramo de proteína (o hasta menos de 100 picogramos/dosis).

El virus entonces se inactiva, mediante su exposición a formaldehído (a aproximadamente 100 microgramos/mililitro) durante un período típicamente de entre 7 y 10 días a temperatura ambiente. Opcionalmente, la suspensión se

filtra (por ejemplo, 0.22 micras) en un punto del tiempo intermedio, tal como en el día 2, 3, 4, ó 5, para remover los aglomerados y mejorar la exposición al formaldehído. En seguida de la inactivación, se puede agregar un tensoactivo de poloxámero al regulador, antes de la ultrafiltración/diafiltración, con el fin de remover el formaldehído y poner el virus de Dengue inactivado purificado en un regulador adecuado para su almacenamiento. El virus de Dengue inactivado purificado entonces se filtra para esterilizarse finalmente antes de su almacenamiento como una preparación a granel del virus de Dengue inactivado. Opcionalmente, se agrega sacarosa a la formulación final de la preparación a granel.

Ejemplo 2: Formulación de composiciones inmunogénicas de ejemplo

La formulación de virus de Dengue inactivado purificado de ejemplo se evaluó bajo diferentes condiciones para resolver el problema de la pérdida de producto durante su almacenamiento, su liofilización, y el subsiguiente manejo. Se evaluaron las siguientes variables en la formulación de la preparación a granel del virus de Dengue inactivado (3.3 microgramos/mililitro por cepa): concentración de regulador de fosfato (pH de 8.5) (5, 15, 30 mM), concentración de tensoactivo de poloxámero (0, 0.001 por ciento, 0.2 por ciento), en la presencia de sacarosa al 5 por ciento, y NaCl 25 mM en agua para inyecciones. El volumen se liofilizó y se reconstituyó en 0.625 mililitros de la solución de resuspensión. El proceso de formulación se ilustra esquemáticamente en la Figura 3A. En la Figura 3B se ilustran las formulaciones alternativas, reemplazando el regulador de fosfato con regulador de Tris, y reduciendo el

volumen unitario para generar una sola dosis de 1.0 a 0.5 mililitros antes de la liofilización. Se apreciará que los ajustes del volumen y las modificaciones del regulador son variables independientes, y se pueden hacer cualquiera o ambas modificaciones por separado o en fila.

Se evaluó la estabilidad de las tortas secas en seguida de la incubación durante 7 días a 4°C y a 37°C. Se evaluaron el aspecto de la torta y la humedad residual del producto seco. Las tortas liofilizadas entonces se reconstituyeron en NaCl, o en diferentes reguladores, para evaluar la estabilidad al pH. Se utilizó un volumen previo a la liofilización de 1.5 mililitros, dando como resultado un factor de concentración de 2.4 veces después de la reconstitución con 0.625 mililitros de la solución de resuspensión. Las composiciones inmunogénicas resuspendidas resultantes se analizaron para determinar la calidad de la torta, y mediante fluorescencia intrínseca a 280/320 nanómetros, contenido de nitrógeno, ELISA, dispersión de luz dinámica, nefelometría, pH, y osmolalidad.

Los resultados de ejemplo se muestran en las Figuras 4A y 4B.

Estos resultados demostraron que, en concentraciones del 0.001 por ciento al 0.2 por ciento, el tensoactivo (Lutrol^{MR}) proporcionó una recuperación completa de la proteína en todas las soluciones de resuspensión probadas. Esto contrastó con la pérdida del contenido de proteína en ausencia del tensoactivo. Sin obligarnos por la teoría, se cree que la pérdida de proteína en ausencia del tensoactivo se debió a la adsorción específica en los frascos, lo cual es impedido por la adición de un tensoactivo adecuado. En una concentración del 0.2 por ciento, el tensoactivo también impidió la acumulación

de las partículas virales.

La concentración del regulador y la composición de la solución de resuspensión no tuvieron impacto alguno sobre la recuperación inicial del producto.

La evaluación inmunológica mediante ELISA demostró se conservaron los epítopos inmunológicos del virus de Dengue inactivado en seguida de la liofilización y reconstitución. Otros detalles con respecto a la liofilización y reconstitución se proporcionan en el Ejemplo 3.

Ejemplo 3: Liofilización de la preparación a granel y reconstitución en una composición inmunogénica

El virus de Dengue inactivado purificado se formuló en una preparación a granel como se describe anteriormente, y como se muestra en la Figura 3B, de acuerdo con las siguientes especificaciones: sacarosa al 5 por ciento, regulador

15 Tris 1-31 mM, NaCl 15 mM, Poloxámero 188 al 0.015-0.2 por ciento con virus de Dengue inactivado purificado a 1.25 microgramos/cepa para cada una de las cuatro cepas. Para la liofilización, la preparación a granel se distribuyó en alícuotas de 0.5 mililitros. La preparación a granel entonces se liofilizó en el

20 siguiente ciclo de secado por congelación de 74 horas: Congelación hasta $\leq -52^{\circ}\text{C}$ durante 1 hora a 1 atmósfera (Atm.); Secado primario a 45 μbar como sigue: 1) Enfriamiento desde -52°C hasta -32°C durante 3 horas; 2) 32°C durante 32 horas; 3) declinación secuencial en la temperatura en incrementos de 1°C con una disminución de 10 minutos seguidos por un período de

25 mantenimiento de 2 horas 25 minutos (total de 7 horas 55 minutos); 4) -28°C

durante 9 horas; Secado secundario como sigue: Incremento de temperatura desde -28°C hasta 37°C durante 9 horas a 45 µbar seguido por 37°C durante 12 horas a 27 µbar. Las muestras liofilizadas entonces se equilibraron hasta entre 2°C y 8°C para completar el ciclo. El producto liofilizado resultante ("torta") se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente después de la rehidratación o durante 1 mes a 37°C ó 3 meses a -20°C, o 5 meses a 4°C en la forma liofilizada para evaluar la estabilidad.

Después de la reconstitución en 0.625 mililitros en el regulador seleccionado, la concentración resultante en la composición inmunogénica fue como sigue: sacarosa al 4 por ciento, fosfato 0.8-24.8 mM, NaCl 12 mM, Poloxámero 188 0.012-0.16 por ciento, virus de Dengue inactivado purificado en 2.0 microgramos. Las composiciones inmunogénicas resultantes se ensayaron para determinar la calidad, estabilidad e inmunogenicidad mediante las siguientes evaluaciones: fluorescencia intrínseca, DLS, Nefelometría, pH, osmolalidad y ELISA. Los resultados representativos se muestran en las Figuras 5A a 5C. Las Figuras 6A y 6B ilustran gráficamente las características de estabilidad (fluorescencia intrínseca y ELISA, respectivamente) después de la reconstitución en regulador de las preparaciones liofilizadas en la presencia y en ausencia del tensoactivo. Todos los datos estuvieron dentro de los valores esperados, con un claro incremento en la recuperación para las formulaciones que contenían tensoactivo, comparándose con las formulaciones sin tensoactivo. No se observó ningún impacto de la concentración del regulador (Tris) sobre los intervalos probados. Se obtuvieron resultados similares en una

variedad de reguladores de reconstitución (por ejemplo, para obtener las composiciones inmunogénicas líquidas adecuadas para su administración con diferentes adyuvantes). Estos resultados demostraron que la liofilización y reconstitución en la presencia del tensoactivo de Poloxámero y regulador para mantener el pH en o mayor al neutro, dieron como resultado una estabilidad e inmunogenicidad favorables en una variedad de composiciones reguladoras.

15

20

25

REIVINDICACIONES

1. Una preparación a granel del virus de Dengue inactivado o una composición inmunogénica, la cual comprende:

uno o más virus de Dengue inactivados purificados;

un agente regulador; y

un tensoactivo de poloxámero.

2. La composición inmunogénica de la reivindicación 1, el cual comprende además un adyuvante.

3. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, en donde el adyuvante comprende una sal de aluminio.

4. La composición inmunogénica de la reivindicación 3, en donde el adyuvante comprende cuando menos uno de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio.

15

5. La composición inmunogénica de la reivindicación 3 ó 4, la cual comprende además cuando menos un componente inmunoestimulante adicional.

20

6. La composición inmunogénica de la reivindicación 5, en donde el cuando menos un componente inmunoestimulante adicional comprende uno o más de una emulsión de aceite y agua, un liposoma, un lipopolisacárido, una saponina, y un oligonucleótido.

7. La composición inmunogénica de la reivindicación 2, en donde el adyuvante es un adyuvante sin aluminio.

25

8. La composición inmunogénica de la reivindicación 7, en donde el

adyuvante sin aluminio comprende uno o más componentes inmunoestimulantes seleccionados a partir del grupo que consiste en: una emulsión de aceite y agua, un liposoma, un lipopolisacárido, una saponina y un oligonucleótido.

9. Una preparación a granel del virus de Dengue inactivado o una composición inmunogénica, la cual comprende:

cuando menos un virus de Dengue inactivado purificado adsorbido sobre una sal de aluminio;

un agente regulador; y

un tensoactivo.

10. La composición inmunogénica de la reivindicación 9, la cual comprende además cuando menos un componente inmunoestimulante adicional.

15 11. La composición inmunogénica de la reivindicación 10, en donde el componente inmunoestimulante comprende uno o más de una emulsión de aceite y agua, un liposoma, un lipopolisacárido, una saponina, y un oligonucleótido.

20 12. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 6, 8, y 11, en donde el uno o más componentes inmunoestimulantes comprenden monofosforilo-lípido A 3-desacilado (3D-MPL).

25 13. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 5, 6, 7, 8, 10, 11, y 12, en donde el uno o más componentes inmunoestimulantes comprenden QS21.

14. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 6, 8, 10, 11, 12, y 13, en donde el componente inmunoestimulante comprende un oligonucleótido de ADN, el cual comprende cuando menos un CpG no metilado.

15. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 6, 8, 10, 11, 12, 13, y 14, en donde el componente inmunoestimulante comprende un liposoma.

16. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tensoactivo es adecuado para su administración intramuscular, subcutánea, transcutánea o intradérmica.

15 17. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tensoactivo se selecciona a partir del grupo que consiste en un poloxámero, hidroxí-estearato de macrogol 15, un polisorbato, un octoxinol, un polidocanol, un polioxiestearato, un aceite de ricino de polioxilo, un N-octil-glucósido, y combinaciones de los mismos.

20 18. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tensoactivo es un poloxámero.

25 19. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tensoactivo de poloxámero tiene un peso molecular de cuando menos

4,500 kD.

20. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tensoactivo de poloxámero tiene un peso molecular de no más de 15,000 kD.

21. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tensoactivo está presente en una cantidad de cuando menos el 0.001 por ciento (peso/volumen).

22. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el tensoactivo está presente en una cantidad de no más del 1.0 por ciento (peso/volumen).

15 23. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición inmunogénica comprende una pluralidad de virus de Dengue inactivados purificados.

20 24. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la pluralidad de virus de Dengue inactivados purificados son de diferentes serotipos.

25 25. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en

donde la pluralidad de virus de Dengue inactivados purificados comprende una pluralidad de virus que provocan una respuesta inmunitaria a cada DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4

26. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cuando menos uno de los virus de Dengue inactivados purificados es un virus de Dengue atenuado.

27. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde cuando menos uno de los virus de Dengue inactivados purificados es un virus de Dengue recombinante.

28. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en
15 donde cuando menos uno de los virus de Dengue inactivados purificados es un virus quimérico, el cual comprende un primer ácido nucleico del virus de Dengue y un segundo ácido nucleico de flavivirus.

29. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la
20 composición inmunogénica de la reivindicación 28, en donde el segundo flavivirus se selecciona a partir de: un segundo ácido nucleico de Dengue, un virus de fiebre amarilla, y un virus de encefalitis japonesa.

30. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la
25 composición inmunogénica de la reivindicación 28 ó 29, en donde el virus de Dengue inactivado purificado quimérico comprende un ácido nucleico que

codifica en una o ambas de una proteína de Dengue M y de Dengue E.

31. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25, en donde cuando menos uno de los virus de Dengue inactivados purificados es un virus de Dengue de tipo silvestre.

32. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el uno o más virus de Dengue inactivados purificados están cada uno presentes en una cantidad de cuando menos 0.1 microgramo y no más de 100 microgramos por una sola dosis humana.

15 33 La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el uno o más virus de Dengue inactivados purificados están cada uno presentes en una cantidad de cuando menos 0.25 microgramos y no más de 10 microgramos por dosis humana.

20 34. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente regulador del pH comprende uno o ambos de fosfato de sodio y fosfato de potasio.

35. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente regulador del pH comprende:

25 Tris-(hidroxi-metil)-amino-metano.

36. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente regulador del pH mantiene el pH en una composición líquida en o mayor a un pH de 6.4.

37. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente regulador del pH mantiene el pH en una composición líquida en o mayor a un pH de 6.8.

38. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el agente regulador del pH mantiene el pH en una composición líquida en o mayor a un pH de 7.0.

15 39. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, la cual comprende además cuando menos uno de un azúcar formador de cristal y un poliol formador de cristal.

20 40. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el azúcar o el poliol formador de cristal se selecciona a partir del grupo que consiste en: sacarosa, trehalosa, manosa, manitol, rafinosa, lactitol, sorbitol y ácido lactobiónico, glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, maltosa, lactosa, iso-maltosa, maltitol, palatinit, estaquiosa, melezitosa, dextrano, o una
25 combinación de los mismos.

41. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el azúcar o el poliol formador de cristal comprende sacarosa.

42. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es un sólido liofilizado.

43. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición es un líquido.

44. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición está en una solución isotónica.

15 45. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición inmunogénica se formula para su administración a un sujeto humano.

20 46. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición inmunogénica se formula en una cantidad de una sola dosis humana de cuando menos 0.05 mililitros, y no más de 2 mililitros.

47. La composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde la composición inmunogénica se formula en una cantidad de una sola dosis humana de entre 0.5 y 1.5 mililitros.

25 48. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la

composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el uno o más virus de Dengue inactivados purificados se inactiva mediante cuando menos uno de un agente inactivador químico, un agente inactivador físico, y un agente inactivador de irradiación.

49. La preparación a granel del virus de Dengue inactivado o la composición inmunogénica de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en donde el uno o más virus de Dengue inactivados purificados se inactiva mediante su exposición a cuando menos uno de formaldehído, beta-propiolactona (BPL), peróxido de hidrógeno, irradiación ultravioleta, e irradiación gamma.

50. Una preparación liofilizada del virus de Dengue inactivado, la cual comprende:

cuando menos un virus de Dengue inactivado purificado;

15

y

un tensoactivo de poloxámero.

51. La preparación liofilizada de la reivindicación 50, la cual comprende además una sal de aluminio.

20

52. La preparación liofilizada de la reivindicación 51, en donde la preparación comprende cuando menos uno de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio.

25

53. La preparación liofilizada de la reivindicación 51 ó 52, en donde el cuando menos un virus de Dengue inactivado purificado es adsorbido sobre el sal de aluminio.

54. La preparación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 53, en donde el tensoactivo se selecciona a partir del grupo que consiste en un poloxámero, hidroxí-estearato de macrogol 15, un polisorbato, un octoxinol, un polidocanol, un polioxiestearato, un aceite de ricino de polioxilo, un N-octil-glucósido, y combinaciones de los mismos.

55. La preparación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 54, en donde el tensoactivo es un poloxámero.

56. La preparación liofilizada de la reivindicación 55, en donde el tensoactivo de poloxámero tiene un peso molecular de cuando menos 4,500 kD.

57. La preparación liofilizada de la reivindicación 55, en donde el tensoactivo de poloxámero tiene un peso molecular de no más de 15,000 kD.

58. La preparación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 57, en donde el tensoactivo está presente en una cantidad de cuando menos el 0.001 por ciento (peso/volumen).

59. La preparación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 58, en donde el tensoactivo está presente en una cantidad de no más del 1.0 por ciento (peso/volumen).

60. La preparación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 59, en donde la composición inmunogénica comprende una pluralidad de virus de Dengue inactivados purificados.

61. La preparación liofilizada de la reivindicación 60, en donde la pluralidad de virus de Dengue inactivados purificados son de diferentes serotipos.

62. La preparación liofilizada de la reivindicación 60 ó 61, en donde la pluralidad de virus de Dengue inactivados purificados comprende una pluralidad de virus que provocan una respuesta inmunitaria a cada DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4

63. La preparación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 62, en donde el cuando menos un virus de Dengue inactivado purificado está presente en una cantidad de cuando menos 0.1 microgramo y no más de 100 microgramos por una sola dosis humana.

64. La preparación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 63, en donde el cuando menos un virus de Dengue inactivado purificado está presente en una cantidad de cuando menos 0.25 microgramos y no más de 10 microgramos por dosis humana.

15 65. La preparación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 64, la cual comprende además cuando menos un componente que actúa como un agente regulador del pH.

20 66. La preparación liofilizada de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 65, la cual comprende además cuando menos uno de un azúcar formador de cristal y un poliol formador de cristal.

25 67. La preparación liofilizada de la reivindicación 66, en donde el azúcar o el poliol formador de cristal se selecciona a partir del grupo que consiste en: sacarosa, trehalosa, manosa, manitol, rafinosa, lactitol, sorbitol y ácido lactobiónico, glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, maltosa, lactosa, iso-maltosa, maltitol, palatinit, estaquiosa, melezitosa, dextrano, o una

combinación de los mismos.

68. Un método para formular una preparación a granel del virus de Dengue inactivado o una composición inmunogénica, el cual comprende:

proporcionar una solución que comprende un agente regulador del pH y un tensoactivo; y

mezclar con la solución uno o más virus de Dengue inactivados purificados.

69. El método de la reivindicación 68, el cual comprende adsorber el uno o más virus de Dengue inactivados purificados sobre una sal de aluminio antes de mezclar con la solución.

70. El método de la reivindicación 69, en donde la sal de aluminio comprende cuando menos uno de hidróxido de aluminio y fosfato de aluminio.

15 71. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 70, el cual comprende adsorber cada uno de una pluralidad de virus de Dengue inactivados purificados sobre una sal de aluminio para producir un mono-volumen previamente adsorbido, y mezclar la pluralidad de mono-volúmenes previamente adsorbidos con la solución.

20 72. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 71, en donde la solución es adecuada para su administración parenteral.

73. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 72, en donde la solución es isotónica.

25 74. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 73, en donde la solución comprende además uno o más de un azúcar formador de cristal; un

poliol formador de cristal; y una sal.

75. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 74, en donde la provisión de la solución comprende agregar al agua sin endotoxina:

un azúcar o poliol formador de cristal;

un agente regulador;

una sal; y

un tensoactivo.

76. El método de la reivindicación 75, en donde cada componente se agrega en secuencia.

77. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 76, en donde el agente regulador del pH comprende cuando menos un componente seleccionado a partir de fosfato de sodio, fosfato de potasio y Tris-(hidroximetil)-amino-metano.

15 78. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 77, en donde el agente regulador del pH se selecciona a partir de la Tabla 1.

79. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 78, en donde el agente regulador del pH mantiene el pH de la preparación a granel o de la composición inmunogénica en o mayor a un pH de 6.4.

20 80. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 79, en donde el agente regulador del pH mantiene el pH de la preparación a granel o de la composición inmunogénica en o mayor a un pH de 6.8.

25 81. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 80, en donde el agente regulador del pH mantiene el pH de la preparación a granel o de la

composición inmunogénica en o mayor a un pH de 7.0.

82. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 81, en donde el tensoactivo es adecuado para su administración intramuscular, subcutánea, transcutánea o intradérmica.

83. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 82, en donde el tensoactivo se selecciona a partir del grupo que consiste en un poloxámero, hidroxi-estearato de macrogol 15, un polisorbato, un octoxinol, un polidocanol, un polioxiestearato, un aceite de ricino de polioxilo, un N-octil-glucósido, y combinaciones de los mismos.

84. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 83, en donde el tensoactivo es un poloxámero.

15 85. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 84, en donde el tensoactivo de poloxámero tiene un peso molecular de cuando menos 4,500 kD.

86. El método de cualquiera de las reivindicaciones 50 a 85, en donde el tensoactivo de poloxámero tiene un peso molecular de no más de 15,000 kD.

20 87. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 86, en donde el tensoactivo está presente en la preparación o en la composición inmunogénica a granel en una cantidad de cuando menos el 0.001 por ciento (peso/volumen).

25 88. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 87, en donde el tensoactivo está presente en la preparación o en la composición inmunogénica a granel en una cantidad de no más del 1.0 por ciento

(peso/volumen).

89. El método de cualquiera de las reivindicaciones 74 a 86, en donde el azúcar o el poliol formador de cristal se selecciona a partir del grupo que consiste en: sacarosa, trehalosa, manosa, manitol, rafinosa, lactitol, sorbitol y ácido lactobiónico, glucosa, maltulosa, iso-maltulosa, lactulosa, maltosa, lactosa, iso-maltosa, maltitol, palatinit, estaquiosa, melezitosa, dextrano, o una combinación de los mismos.

90. El método de cualquiera de las reivindicaciones 74 a 89, en donde el azúcar o el poliol formador de cristal comprende sacarosa.

91. El método de cualquiera de las reivindicaciones 74 a 90, en donde la sal comprende una sal mineral.

92. El método de cualquiera de las reivindicaciones 74 a 91, en donde la sal mineral comprende cloruro de sodio.

15 93. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 92, en donde la preparación o la composición inmunogénica a granel comprende una pluralidad de virus de Dengue inactivados purificados.

20 94. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 93, en donde la pluralidad de virus de Dengue inactivados purificados son de diferentes serotipos.

25 95. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 94, en donde la pluralidad de virus de Dengue inactivados purificados comprende una pluralidad de virus que provocan una respuesta inmunitaria a cada DEN-1, DEN-2, DEN-3 y DEN-4

96. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 95, en donde cuando menos uno de los virus de Dengue inactivados purificados es un virus de Dengue atenuado.

97. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 96, en donde cuando menos uno de los virus de Dengue inactivados purificados es un virus de Dengue recombinante.

98. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 97, en donde cuando menos uno de los virus de Dengue inactivados purificados es un virus quimérico, el cual comprende un primer ácido nucleico del virus de Dengue y un segundo ácido nucleico de flavivirus.

99. El método de la reivindicación 98, en donde el segundo flavivirus se selecciona a partir de: un segundo ácido nucleico de Dengue, un virus de fiebre amarilla, y un virus de encefalitis japonesa.

15 100. El método de la reivindicación 98 ó 99, en donde el virus de Dengue inactivado purificado quimérico comprende un ácido nucleico que codifica en una o ambas de una proteína de Dengue M y de Dengue E.

20 101. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 95, en donde cuando menos uno de los virus de Dengue inactivados purificados es un virus de Dengue de tipo silvestre.

25 102. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 96, en donde el uno o más virus de Dengue inactivados purificados están cada uno presentes en una cantidad de cuando menos 0.1 microgramo y no más de 100 microgramos.

103. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 102, en donde el uno o más virus de Dengue inactivados purificados están cada uno presentes en una cantidad de cuando menos 0.25 microgramos y no más de 10 microgramos.

104. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 103, en donde el virus de Dengue inactivado purificado se inactiva mediante cuando menos uno de un agente inactivador químico, un agente inactivador físico, y un agente inactivador de irradiación.

105. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 104, en donde el virus de Dengue inactivado purificado se inactiva mediante su exposición a cuando menos uno de formaldehído, beta-propiolactona (BPL), peróxido de hidrógeno, irradiación ultravioleta, e irradiación gamma.

15 106. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 105, el cual comprende además liofilizar la solución que comprende el cuando menos un virus de Dengue inactivado purificado, para producir una composición liofilizada.

20 107. El método de la reivindicación 106, el cual comprende además volver a suspender la composición liofilizada en una solución farmacéuticamente aceptable.

108. El método de la reivindicación 107, en donde la solución farmacéuticamente aceptable es agua para inyecciones.

109. El método de la reivindicación 107, en donde la solución farmacéuticamente aceptable comprende cuando menos un adyuvante.

25 110. El método de la reivindicación 109, en donde el adyuvante

comprende uno o más de una sal de aluminio, una emulsión de aceite y agua, un lipopolisacárido, una saponina, y un oligonucleótido.

111. El método de la reivindicación 110, en donde el lipopolisacárido comprende monofosforilo-lípido A 3-desacilado (3D-MPL).

112. El método de la reivindicación 110 ó 111, en donde la saponina comprende QS21.

113. El método de cualquiera de las reivindicaciones 110 a 112, en donde el oligonucleótido es un oligonucleótido de ADN, el cual comprende cuando menos un CpG no metilado.

114. El método de cualquiera de las reivindicaciones 110 a 113, en donde el adyuvante comprende un liposoma.

115. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 113, en donde la composición inmunogénica es adecuada para su administración a un sujeto humano.

116. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 115, en donde la composición inmunogénica se formula en una cantidad de una sola dosis de cuando menos 0.05 mililitros, y no más de 2 mililitros.

117. El método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 116, en donde la composición inmunogénica se formula en una cantidad de una sola dosis de entre 0.5 y 1.5 mililitros.

118. Un método para reducir cuando menos una de la adsorción y/o la acumulación no específica de un virus de Dengue inactivado purificado, el cual comprende formular el virus de Dengue inactivado de acuerdo con el método de

cualquiera de las reivindicaciones 68 a 117.

119. Un método para mejorar la recuperación de un virus de Dengue inactivado antigénicamente conservado, el cual comprende formular el virus de Dengue inactivado de acuerdo con el método de cualquiera de las reivindicaciones 68 a 118.

15

20

25

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION PCT		
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 26-11-13 (30) Prioridad (31) No. Prioridad (32) Fecha (33) País 61/490,205 26-05-11 US 61/570,966 15-12-11 US		(51) Int Cl: A61K 39/12 (71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (72) Inventor(es): HENDERICKX, Veronique; LE BUSSY, Olivier; LEMOINE, Dominique, Ingrid y MATHOT, Frederic. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE
(85) Fecha límite inicio fase nacional: 26-12-13 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 25-05-12 No. de solicitud: PCT/EP2012/059879 (87) Publicación internacional Fecha: 29-11-12 No. publicación: WO 2012/160199 A1		
(54) Título: "VACUNA DE VIRUS DE DENGUE INACTIVADO"		

Resumen - Reivindicación(es):

Resumen.-

La presente invención proporciona formulaciones de una composición inmunogénica que contiene un virus de Dengue inactivado purificado, y un método para su producción.

Sector: Inmunología. Composición inmunológica para prevención de la infección por virus de dengue.

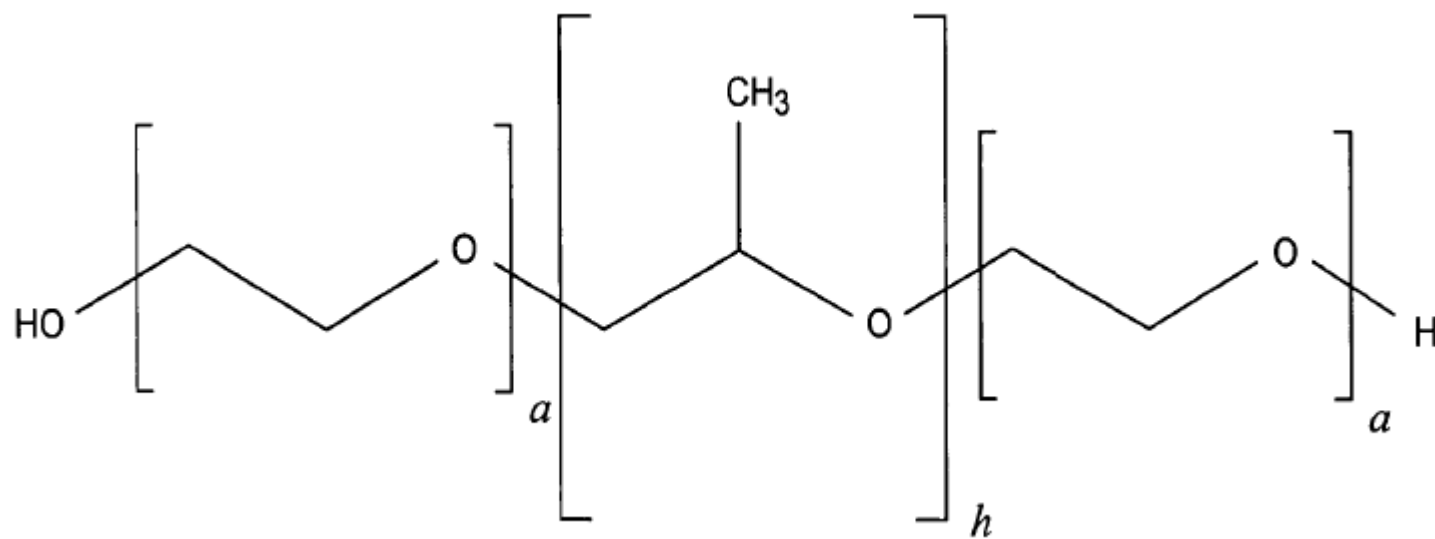


FIG. 1

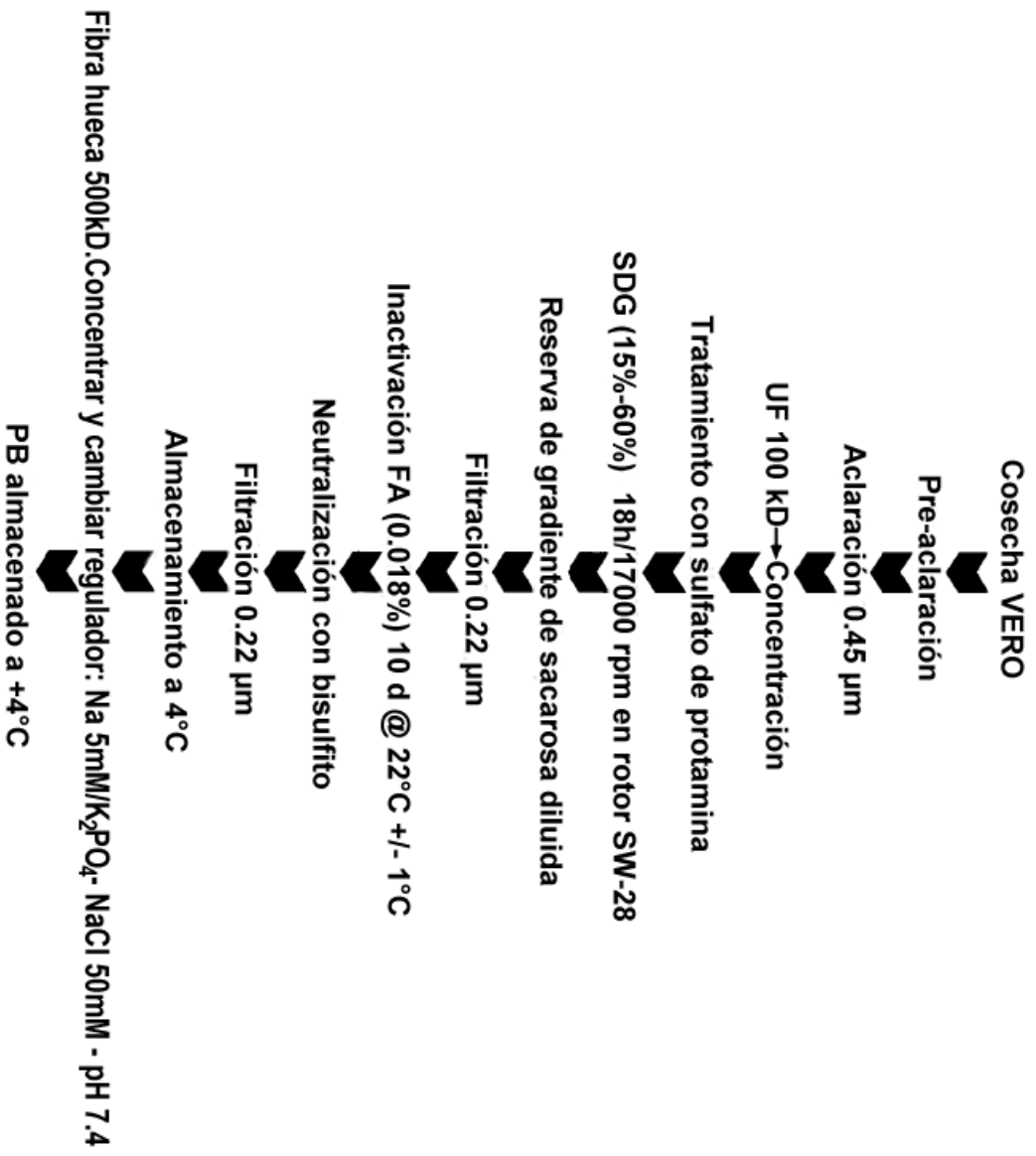
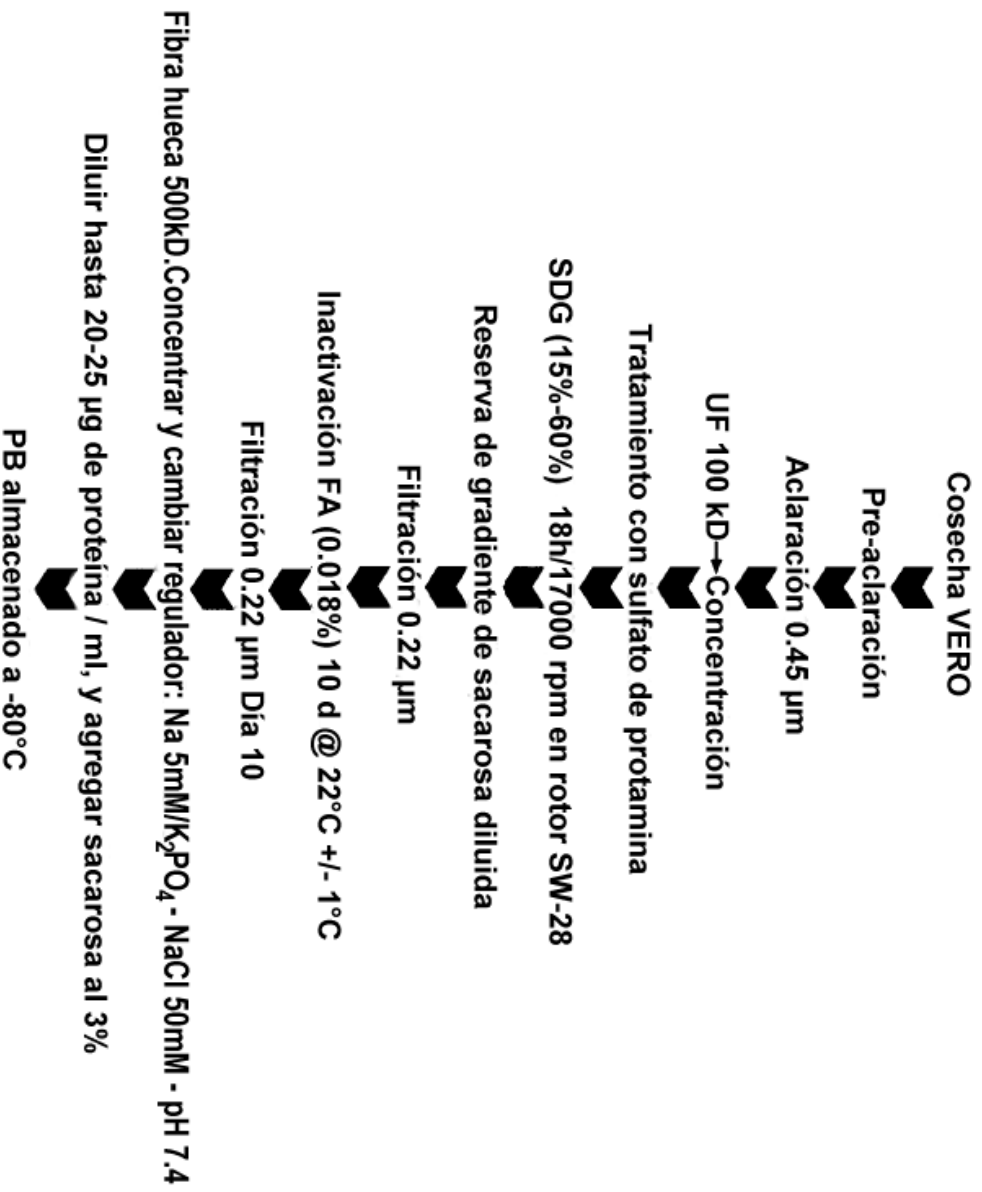


FIG. 2A

**FIG. 2B**

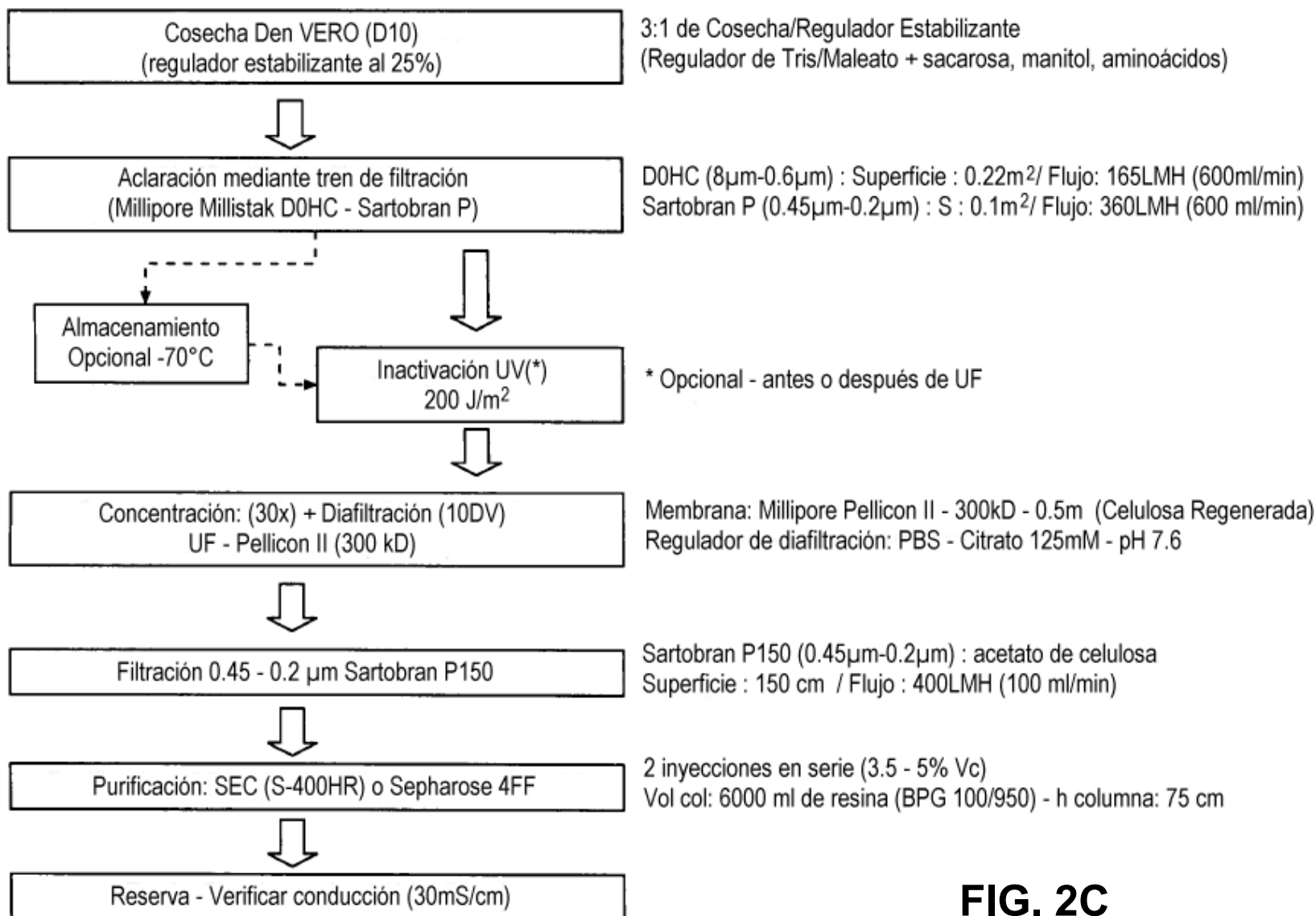


FIG. 2C

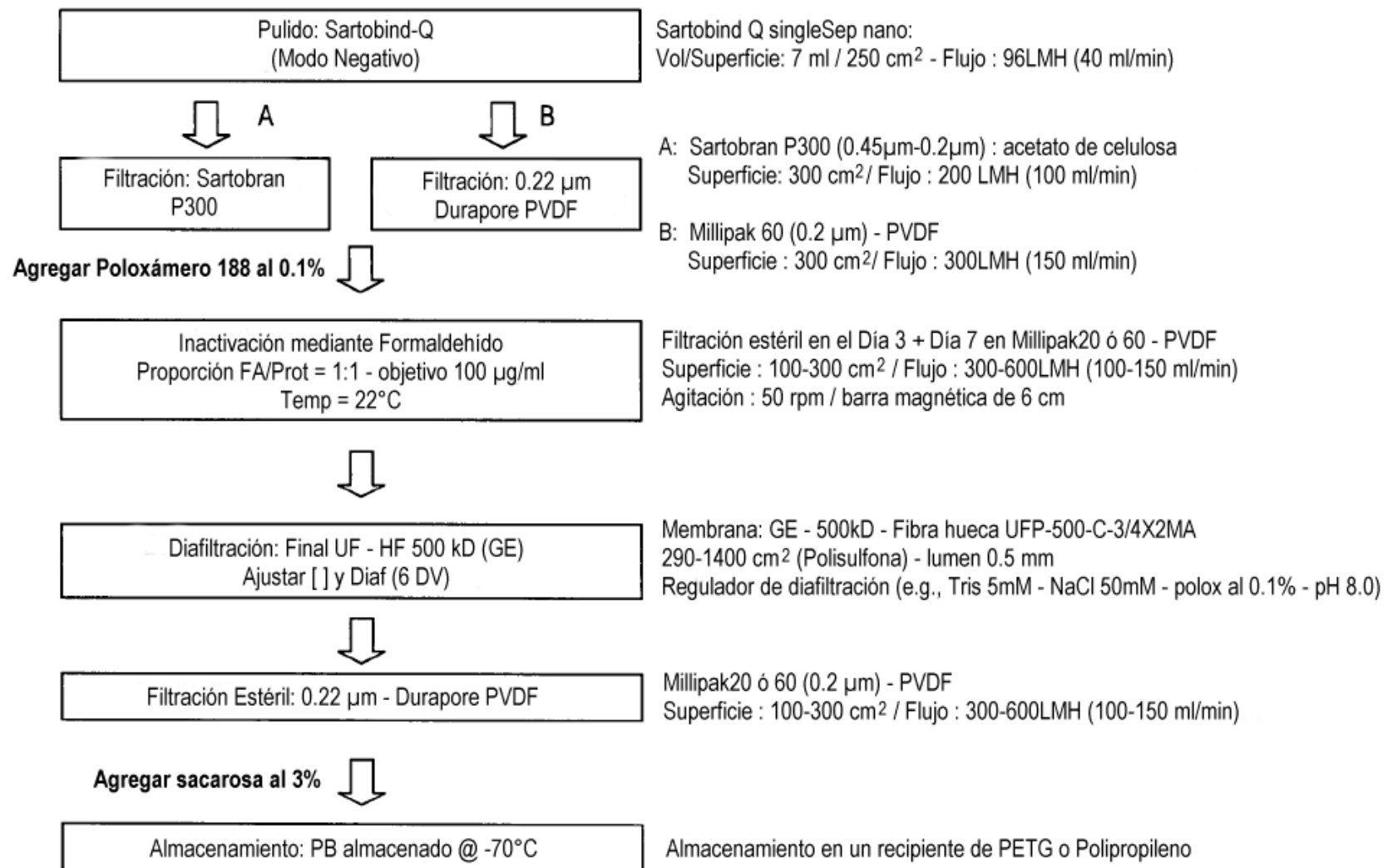


FIG. 2D

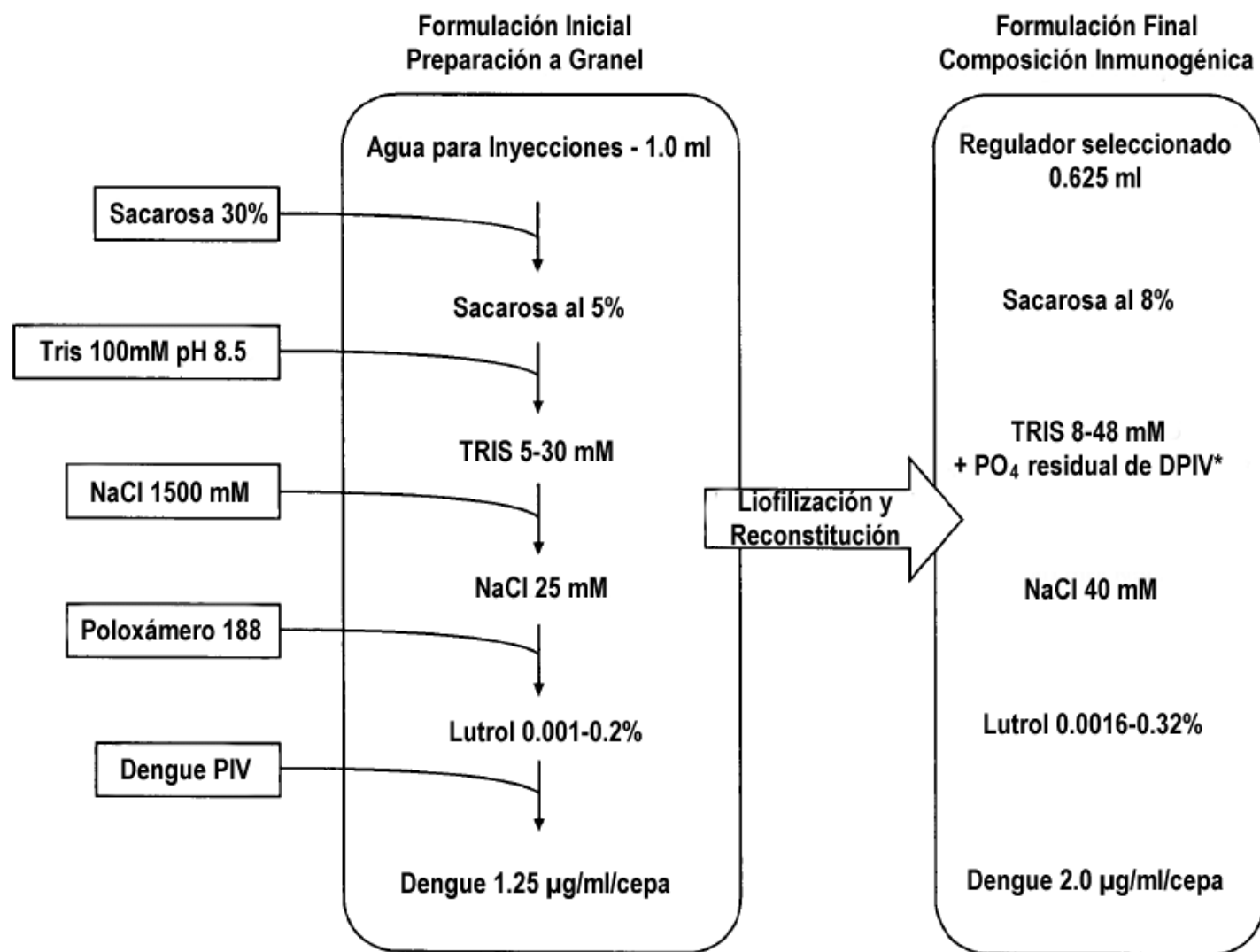


FIG. 3A

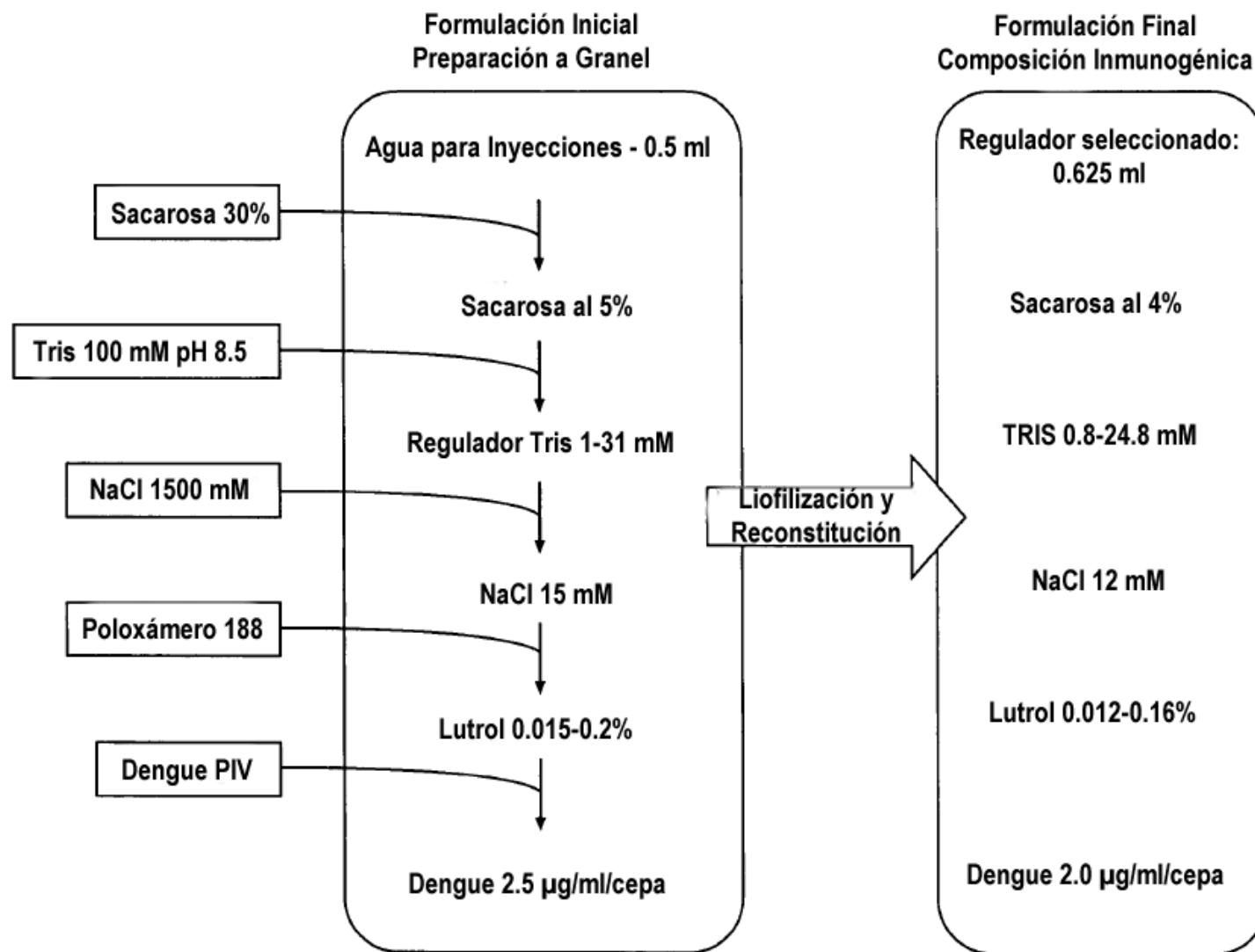


FIG. 3B

MUESTRAS		RECONSTITUCIÓN EN 625 µl	CONC. µg/mL DESPUÉS DE RECONSTITUCIÓN		RECUPERACIÓN UV						RECUPERACIÓN FLUO						RECUPERA- CIÓN ELISA	
GRUPOS	COMPOSICIONES				T7d4°C (NC)	T7d4°C (C)	T7d4°C (F)	T7d37°C (NC)	T7d37°C (C)	T7d37°C (F)	T7d4°C (NC)	T7d4°C (C)	T7d4°C (F)	T7d37°C (NC)	T7d37°C (C)	T7d37°C (F)	T7d4°C (NC)	T7d37°C (NC)
					%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
1	DEN 11-08-01	TRIS 5mM LUTROL 0.2%	Tp AS03	8	164	115	195	155	155	119	119	88	278	133	115	124	128	122
2	DEN11-08-02	TRIS 5mM LUTROL 0.2%	NaCl 150mM	8	106	111	177	128	102	71	111	84	283	131	94	162	117	122
3	DEN11-08-03	TRIS 30mM LUTROL 0.2%	NaCl 150mM	8	155	124		124	128	66	120	87		124	122	121	117	117
4	DEN11-08-04	TRIS 5mM LUTROL 0%	Tp AS01-B3	8	141	53	133	150	75	40	101	37	59	107	47	52	83	78
5	DEN11-08-05	TRIS 30mM LUTROL 0%	Tp AS03	8	146	84	159	168	97	88	99	44	378	99	51	55	72	67
6	DEN11-08-06	TRIS 30mM LUTROL 0.2%	Tp AS01-B3	8	195	119	168	150	141	80	153	94	267	124	96	113	111	128
7	DEN11-08-07	TRIS 30mM LUTROL 0%	NaCl 150mM	8	119	58	75	133	80	13	95	41	145	100	62	66	89	72
8	DEN11-08-08	TRIS 5mM LUTROL 0.2%	Tp AS01-B3	8	159	115	150	150	137	102	136	100	205	139	107	282	122	117
9	DEN11-08-09	TRIS 5mM LUTROL 0%	NaCl 150mM	8	102	35	31	128	62	4	94	42	51	99	52	120	72	89
10	DEN11-08-10	TRIS 15mM LUTROL 0.001%	Tp AS01-B3	8	159	133	141	190	168	102	129	94	201	125	92	112	111	117
11	DEN11-08-11	TRIS 5mM LUTROL 0%	Tp AS03	8	150	84	97	155	84	49	107	53	141	104	49	176	78	78
12	DEN11-08-12	TRIS 5mM LUTROL 0.001%	Tp AS03	8	164	119	146	186	177	137	131	95	119	137	104	337	139	117
13	DEN11-08-13	TRIS 30mM LUTROL 0%	Tp AS01-B3	8	133	62	111	181	106	111	92	46	146	89	48	174	83	78
14	DEN11-08-14	TRIS 30mM LUTROL 0.2%	Tp AS03	8	155	133	146	358	199	305	129	95	118	119	98	114	144	144
15	DEN11-08-15	TRIS 15mM LUTROL 0%	Tp AS01-B3	8	141	75	128	168	124	146	95	42	232	96	56	67	78	72
16	DEN11-08-16	PLACEBO SACAROSA	NaCl 150mM	8	-4	-4	-4	-4	-4	-4	1	1	1	1	1	1		
17	CTRL PB	PB EDEN4P03		30.7				87				95					100	

CRITERIOS DE ACEPTACIÓN

+ 80
+/- 60
- 59

+ 80
+/- 60
- 59

+ 80 + 90
+/- 60 +/- 80
- 59 - 59

FIG. 4A

COMPOSICIONES	RECONSTITUCIÓN EN 625 µL	DLS (Wyatt)						NEPHELO						pH		OSMO		CQR	
		T7d4°C (NC)	T7d4°C (NC)	T7d4°C (F)	T7d37°C (NC)	T7d37°C (C)	T7d37°C (F)	T7d4°C (NC)	T7d4°C (C)	T7d4°C (F)	T7d37°C (NC)	T7d37°C (C)	T7d37°C (F)	T7d4°C	T7d37°C	T7d4°C	T7d37°C	TO	T7
		Ø nm	Ø nm	Ø nm	Ø nm	Ø nm	Ø nm	NU	NU	NU	NU	NU	NU			mOsm/l	mOsm/l		
TRIS 5mM LUTROL 0.2%	Tp AS03		96.8	108.5		105.9	111.4	17.1	20.1	10.3	19.9	39.9	12.0	7.5	7.63	602	603	92.1	92
TRIS 5mM LUTROL 0.2%	NaCl 150mM		103.2	107.2		102.2	109.4	11.9	16.1	10.2	19.7	21.4	12.9	8.18	8.29	605	610	92.1	90.2
TRIS 30mM LUTROL 0.2%	NaCl 150mM		104.4	0.7		101.2	104.6	14.0	13.2	4.3	19.8	107.6	11.8	8.42	8.31	657	655	85.7	86
TRIS 5mM LUTROL 0%	Tp AS01-B3		154.0	132.6		352.3	135.1	11.3	12.9	9.4	21.5	13.7	11.4	7.01	7.06	617	606	94.5	94.4
TRIS 30mM LUTROL 0%	Tp AS03		206.6	154.3		271.4	174.0	18.6	18.3	15.3	28.5	14.1	9.3	8.36	8.39	646	645	91.2	91.8
TRIS 30mM LUTROL 0.2%	Tp AS01-B3	126.7	104.5	107.6	125.0	102.0	105.3	16.0	14.9	14.7	24.7	24.7	11.6	8.23	8.2	667	671	84.3	84.8
TRIS 30mM LUTROL 0%	NaCl 150mM		196.4	125.8		275.4	148.6	17.9	20.9	10.5	21.0	34.6	8.5	8.51	8.52	651	653	79.9	80.6
TRIS 5mM LUTROL 0.2%	Tp AS01-B3		109.6	115.8		114.9	111.4	15.3	17.8	10.9	19.8	25.1	11.2	6.86	6.97	613	611	92.7	92.6
TRIS 5mM LUTROL 0%	NaCl 150mM		231.3	117.6		273	139.5	14.6	14.8	10.2	35.5	24.9	10.6	8.32	8.36	599	604	93.5	93.2
TRIS 15mM LUTROL 0.001%	Tp AS01-B3		158.1	123.7		213.4	126.1	14.4	20.1	10.4	17.7	20.5	12.3	7.92	7.88	644	635	93	93
TRIS 5mM LUTROL 0%	Tp AS03		217.2	134.9		312.9	216.8	16.9	13.2	10.1	16.2	14.4	10.0	7.67	7.68	601	597	93.8	91.6
TRIS 5mM LUTROL 0.001%	Tp AS03		136.4	116.2		169.3	121.2	13.6	12.7	10.0	15.7	33.3	11.7	7.64	7.64	601	601	83.7	83.8
TRIS 30mM LUTROL 0%	Tp AS01-B3		196.5	148.4		240.5	172.9	16.8	13.4	9.9	20.6	16.8	11.8	8.24	8.27	664	665	78.5	776
TRIS 30mM LUTROL 0.2%	Tp AS03		102.4	108.6		109.4	101.8	18.5	25.2	11.7	19.5	30.4	13.6	8.26	8.23	657	658	85.9	85.9
TRIS 15mM LUTROL 0%	Tp AS01-B3		202.9	124.3		271.7	164.3	13.5	18.9	10.7	20.7	27.2	13.8	7.97	7.32	631	628	91.8	92.3
PLACEBO SACAROSA	NaCl 150mM		94.7	83.2		172.4	1.0	12.5	12.8	9.0	12.1	9.9	10.3	6.7	6.35	540	535	95.2	95.1
PB EDEN4P03																			
CRITERIOS DE ACEPTACIÓN		- 170						- 40						+ 7.5		- 850		+ 80	
		+/- 140						+/- 20						+/- 7		+/- 300		+/- 60	
		+ 139						+ 19						- 6.7		+ 299		- 59	

FIG. 4B

MUESTRAS			RECUPERACIÓN FLUO									
	COMPOSICIONES	RECONSTITU- CIÓN EN 625 µl	TO (NC)	TO (F)	T24H RT (NF)	T24H RT (F)	TT1M37° C (NF)	TT1M37° C (F)	T5M4° NF	T3M- 20°C NF	T5M4°C /TO F	T5M4°C/ T24HRT F
			%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
1	DEN11-15/01 TRIS 15mM LUTROL 0.15% BISULFITO FA NaCL 25mM	NaCl	97	66			104	109	108	110	100	
2		tp AS01E-3	97	114	95	95	108	126	105	114	90	79
3		tp AS03B	103	30			107	98	110	116	85	104
4		SUCCINATO pH 5	75	95			79	94	94	97	4	
5		NaCl 70°C-60min	58	3			73	46	80	81	85	
6	DEN11-15/02 PLACEBO SACAROSA 25mM NaCL	NaCl										
7	PB DEN 1		158	137					66		33	
8	PB DEN 2		153	164					153		100	
9	PB DEN 3		145	54					73		58	
10	PB DEN 4		118	80					117		66	
11	PB mezcla		97	115					101		63	

CRITERIOS DE
ACEPTACIÓN

+ 80
+/- 60
- 59

FIG. 5A

MUESTRAS			DLS (Wyatt)									
	COMPOSICIONES	RECONS- TITUCIÓN EN 625µl	TO (NF)	TO (F)	T24H RT (NF)	T24H RT (NF)	T1M37°C (NF)	T1M37°C (NF)	T3M-20°C (NF)	T5M4°C (NF)	T5M4°C/ TO (NF)	T5M4°C T24HRT (F)
			ø nm	ø nm	ø nm	ø nm	ø nm	ø nm	ø nm	ø nm	ø nm	ø nm
1	DEN11-15/01 TRIS 15mM LUTROL 0.15% BISULFITO FA NaCL 25mM	NaCl	138	123			153	121	151	168	97	
2		tp AS01E-3	99	130	158	123	157	125	159	150	98	107
3		tp AS003B	106	126			158	122	157	151	101	108
4		SUCCINATO pH 5	322	253			391	239	355	342	12	
5		NaCl 70°C-60min	193	135			185	134	176	181	105	
6	DEN11-15/02 PLACEBO SACAROSA 25mM NaCL	NaCl	2	2								
7	PB DEN 1		115	141						117	103	
8	PB DEN 2		142	125						122	110	
9	PB DEN 3		121	112						132	111	
10	PB DEN 4		154	145						190	152	
11	PB MEZCLA		196	170						173	152	

CRITERIOS DE
ACEPTACIÓN

- 200
+/- 170
+ 150

FIG. 5B

1	2	3	4	5	6	7	8										
						F											
				TO	TO		T24H RT										
				DEN 1	DEN 2	DEN 3	DEN 4										
				DEN 1	DEN 2	DEN 3	DEN 4										
				DEN 1	DEN 2	DEN 3	DEN 4										
RESULTADOS EN µl/ml																	
TORTA T5M/4°C	1	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	NaCl 150mM	2	2.69	2.01	2.44	2.35	1.88	1.87	1.86	2.64					
	2	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	REGULADOR AS01	2	2.33	1.73	2.11	1.96	1.68	1.54	1.69	2.41	51	1.95	1.41	1.49	2.18
	3	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	REGULADOR AS03	2	2.19	1.81	2.06	1.85	1.61	1.43	1.65	2.58	52	3.04	1.88	1.7	2.91
	4	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	SUCCINATO	2	4.41	2.57	6.04	2.72									
	5	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	NaCl 150mM 70°C 1H	2	<	<	<	<									
	6	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	AS01E-3	2	1.95	1.36	2.09	1.77									
	7	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	AS03B	2	1.85	1.14	1.74	1.36									
	8	PLACEBO SACAROSA NACl 25mM	NaCl 150mM	0	<	<	<	<									
	9	DEN 1LOTE1698		15	5.58	<	<	<									
	10	DEN 2LOTE1700		18	<	14.33	<	<									
	11	DEN 3LOTE1686		14	<	<	11.92	<									
	12	DEN 4LOTE1713		30	0.49	0.3	0.41	23.59									
	13	MEZCLA 4V 14µg/mL			1.44	2.86	3.65	2.53									
				TO													
				DEN 1	DEN 2	DEN 3	DEN 4										
RESULTADOS EN µl/ml																	
TORTA T3M/-20°C	14	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	NaCl 150mM	2	2.49	1.9	1.92	1.81									
	15	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	REGULADOR AS01	2	3.07	2.66	2.62	2.44									
	16	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	REGULADOR AS03	2	2.28	2.07	1.84	1.7									
	17	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	SUCCINATO	2	4.84	3.77	4.61	2.49									
	18	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	NaCl 150mM 70°C 1H	2	<	<	<	<									
	19	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	AS01E-3	2	1.73	1.54	1.98	1.5									
	20	TRIS 15mM LUTROL 0.15% + BISULFITO + FORMALINA 25mM NaCl	AS03B	2	1.59	1.35	1.58	0.94									
	21	PLACEBO SACAROSA NACl 25mM	NaCl 150mM	0	<	<	<	<									

1 - MUESTRAS

2 - COMPOSICIONES

3 - RECONSTITUCIÓN EN 625 µl

4 - CONC. µg/ml POR VALENCIA DESPUÉS DE RECONSTITUCIÓN

5 - INCUBACIÓN ANTES DE RECONSTITUCIÓN T5M4°C (TORTA)

6 - INCUBACIÓN ANTES DE RECONSTITUCIÓN T5M4°C (TORTA)

7 - MUESTRAS

8 - INCUBACIÓN DESPUÉS DE RECONSTITUCIÓN (TORTA 4°C)

FIG. 5C

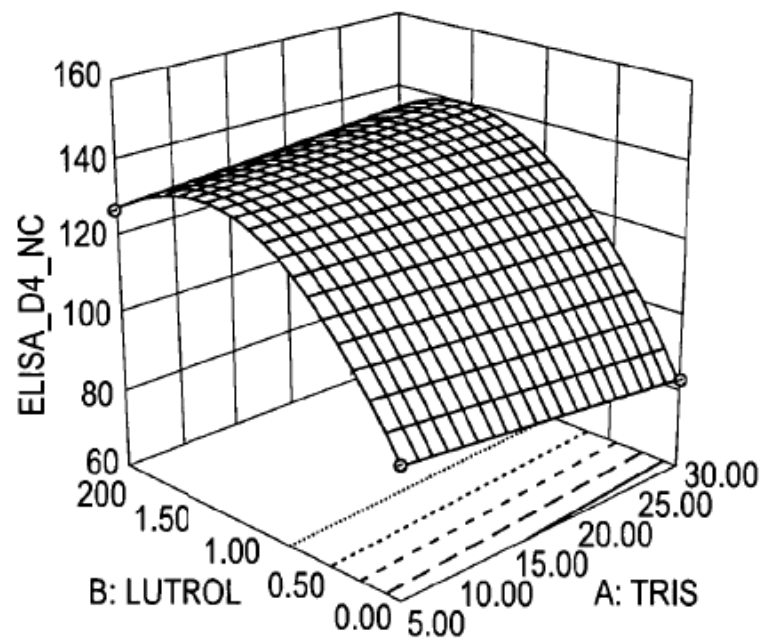
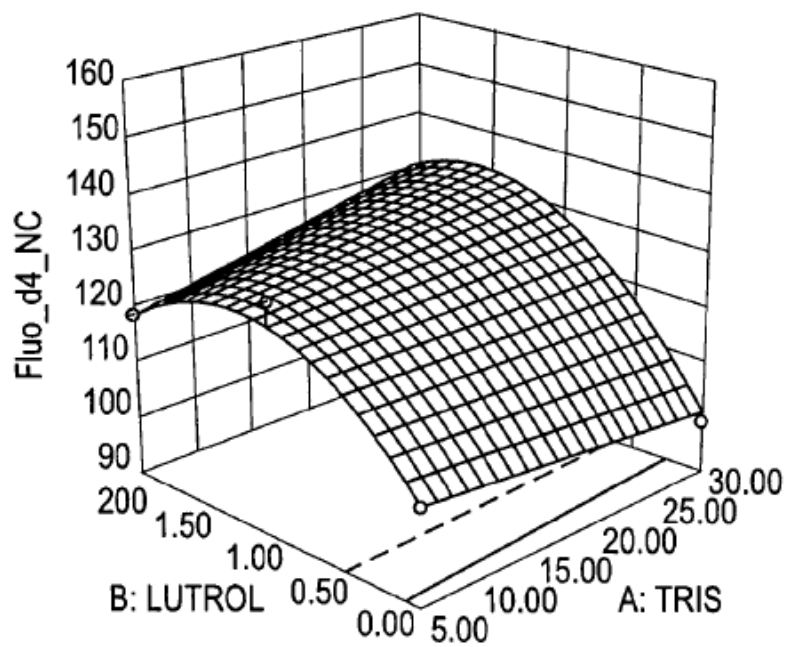


FIG. 6A

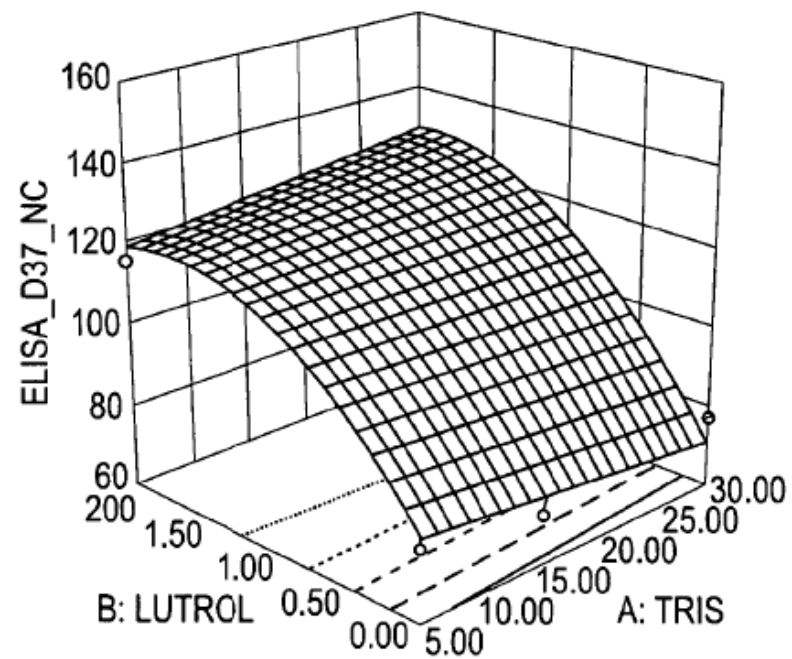
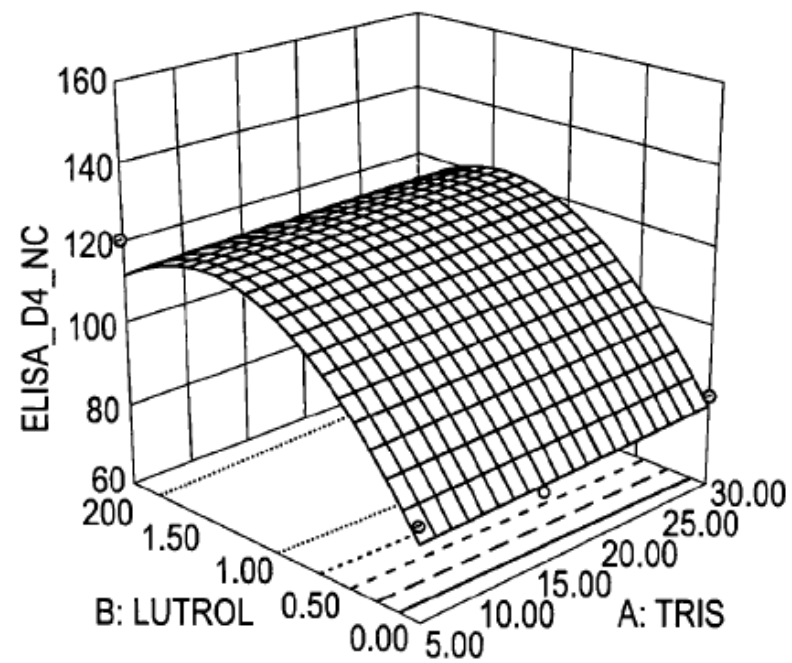


FIG. 6B

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY (PCT Rule 43bis.1)

Date of mailing
(day/month/year) see form PCT/ISA/210 (second sheet)

Applicant's or agent's file reference
see form PCT/ISA/220

FOR FURTHER ACTION
See paragraph 2 below

International application No.
PCT/EP2012/059879

International filing date (day/month/year)
25.05.2012

Priority date (day/month/year)
26.05.2011

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV. A61K39/12 A61K47/10

Applicant
GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA

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

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

2. FURTHER ACTION

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

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

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

Name and mailing address of the ISA:



European Patent Office
P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk - Pays Bas
Tel. +31 70 340 - 2040
Fax: +31 70 340 - 3016

Date of completion of
this opinion

see form
PCT/ISA/210

Authorized Officer

Noë, Veerle

Telephone No. +31 70 340-4181



Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:
 - ☒ the international application in the language in which it was filed
 - ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).
2. ☐ This opinion has been established taking into account the **rectification of an obvious mistake** authorized by or notified to this Authority under Rule 91 (Rule 43bis.1(a))
3. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, this opinion has been established on the basis of a sequence listing filed or furnished:
 - a. (means)
 - ☐ on paper
 - ☐ in electronic form
 - b. (time)
 - ☐ in the international application as filed
 - ☐ together with the international application in electronic form
 - ☐ subsequently to this Authority for the purposes of search
4. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.
5. Additional comments:

Box No. IV Lack of unity of invention

1. ☒ In response to the invitation (Form PCT/ISA/206) to pay additional fees, the applicant has, within the applicable time limit:
- ☒ paid additional fees
 - ☐ paid additional fees under protest and, where applicable, the protest fee
 - ☐ paid additional fees under protest but the applicable protest fee was not paid
 - ☐ not paid additional fees
2. ☐ This Authority found that the requirement of unity of invention is not complied with and chose not to invite the applicant to pay additional fees.
3. This Authority considers that the requirement of unity of invention in accordance with Rule 13.1, 13.2 and 13.3 is
- ☐ complied with
 - ☒ not complied with for the following reasons:
see separate sheet
4. Consequently, this report has been established in respect of the following parts of the international application:
- ☒ all parts.
 - ☐ the parts relating to claims Nos.

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

1. Statement
- | | | |
|-------------------------------|-------------|--------------|
| Novelty (N) | Yes: Claims | <u>1-119</u> |
| | No: Claims | |
| Inventive step (IS) | Yes: Claims | |
| | No: Claims | <u>1-119</u> |
| Industrial applicability (IA) | Yes: Claims | <u>1-119</u> |
| | No: Claims | |
2. Citations and explanations
- see separate sheet**

Box No. VII Certain defects in the international application

The following defects in the form or contents of the international application have been noted:

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

IV. Lack of unity (Continuation)

- 1.1 The present application does not satisfy the requirements of Rule 13.1, 13.2 and 13.3 PCT as the requisite unity of invention does not exist inasmuch as a technical relationship involving one or more of the same or corresponding special technical features does not exist between the subject-matter of the following inventions.
- 1.2 The technical problem underlying the present application is the provision of immunogenic compositions comprising a purified inactivated Dengue virus, a buffer and a surfactant.
- 1.3 The solutions to this technical problem provided by the application are :
 - 1.3.1 1) **Invention 1** : claims 1-8, 18-20, 50-67, 84-86 (completely) and 9-17, 21-49, 68-83, 87-119 (partially) : immunogenic compositions comprising a purified inactivated Dengue virus, a buffer and a poloxamer surfactant
 - 1.3.2 2) **Invention 2** : claims 9-17, 21-49, 68-83, 87-119 (partially) : immunogenic compositions comprising a purified inactivated Dengue virus adsorbed onto an aluminium salt, a buffer and a surfactant
- 1.4 The technical feature shared by the inventions above is an immunogenic composition comprising a purified inactivated Dengue virus, a buffer and a surfactant.
- 1.5 This is known from the following prior art document :

WO2010/094663 discloses an immunogenic composition comprising a purified inactivated Dengue virus, a buffer and a surfactant (see paragraphs 10, 38, 40-44, 66, examples).
- 1.6 In view of this prior art document, the technical problem underlying the present application can be defined as the provision of an alternative immunogenic composition comprising a purified inactivated Dengue virus, a buffer and a surfactant.
- 1.7 Taking into account the disclosure in the prior art, bearing in mind the essential differences among the solutions provided (see above 1-2) and considering that no other technical feature can be acknowledged which in the light of the prior art, could be regarded as a special technical feature in the sense of Rule 13.2 PCT, the International Search Authority is of the opinion that there is no single novel inventive concept underlying the plurality of inventions of the present application in the sense of Rule 13.1 PCT.

- 1.8 Consequently there is a lack of unity and the different inventions not belonging to a common inventive concept are formulated as the different subjects in the invitation pursuant to Article 17(3)(a) PCT.

V. Reasoned statement (Continuation)

2 CITATIONS

Reference is made to the following documents:

- D1 WO 2010/094663 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BARAS BENOIT [BE]; GHEYSEN DIRK [BE];) 26 August 2010 (2010-08-26)cited in the application
- D2 SULI J ET AL: "Experimental squalene adjuvant - I. Preparation and testing of its effectiveness",
VACCINE, ELSEVIER LTD, GB,
vol. 22, no. 25-26, 3 September 2004 (2004-09-03), pages 3464-3469,
XP004526924,
ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2004.02.023
- D3 US 6 254 873 B1 (PUTNAK J ROBERT [US] ET AL) 3 July 2001 (2001-07-03)
- D5 ROBERT PUTNAK J ET AL: "An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model",
VACCINE, ELSEVIER LTD, GB,
vol. 23, no. 35, 15 August 2005 (2005-08-15), pages 4442-4452,
XP027651869,
ISSN: 0264-410X
[retrieved on 2005-08-15]
- D6 ASCARATEIL S ET AL: "Surfactants in vaccine adjuvants: description and perspectives",
VACCINE, ELSEVIER LTD, GB,
vol. 24, 12 April 2006 (2006-04-12), pages S83-S85, XP028010943,
ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2005.01.134
[retrieved on 2006-04-12]

D7 NEWMAN M J ET AL: "USE OF NONIONIC BLOCK COPOLYMERS IN
 VACCINES AND THERAPEUTICS",
 CRITICAL REVIEWS IN THERAPEUTIC DRUG CARRIER SYSTEMS,
 BEGELL HOUSE PUBLISHING INC, US,
 vol. 15, no. 2, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 89-142,
 XP009002052,
 ISSN: 0743-4863

INVENTION 1 :

3 NOVELTY (Art. 33(2) PCT)

3.1 The present application satisfies the criterion set forth in Article 33(2) PCT because the subject - matter of claims 1-8,18-20,50-67,84-86 (completely) and 9-17,21-49,68-83,87-119 (partially) (see subject 1) is new in respect of prior art as defined in the regulations (Rule 64(1) - (3) PCT).

4 INVENTIVE STEP (Art. 33(3) PCT)

4.1 For inventive step analysis of claim 1, D2 is considered to represent the most relevant state of the art and discloses an immunogenic composition comprising a poloxamer surfactant, an inactivated virus (rabies or porcine parvovirus) and a buffer (see abstract; point 2.1 and 2.3.2). The subject - matter of claim 1 differs in that an immunogenic composition comprising an inactivated dengue virus is claimed.

4.2 The problem to be solved by the subject matter of claim 1 may therefore be regarded as the provision of an immunogenic composition comprising an alternative inactivated virus. The solution would be an immunogenic composition comprising an inactivated dengue virus.

4.3 This solution cannot however be considered as involving an inventive step because it would be obvious for the person skilled in the art to replace the inactivated viruses disclosed in D2 by other inactivated viruses. The fact that adjuvant comprising the poloxamer surfactant induces an improved immune response on 2 inactivated viruses shows that these can easily be replaced by other inactivated viruses, e.g. dengue virus especially since vaccines comprising inactivated dengue viruses are well-known in the art (see D1 and D3).

- 4.4 For the same reasons also the lyophilised preparation of claim 50, the method of formulating the immunogenic composition of claim 68 is not considered to involve an inventive step.
- 4.5 Claims 118 and 119 are not considered to be inventive since these claims do not solve the problem over the whole scope of the claim since the effect of reducing nonspecific adsorption and/or aggregation enhancing recovery has only been demonstrated for immunogenic compositions comprising a purified inactivated dengue virus, a phosphate or Tris buffer at pH above neutral, 0.001%-0.2% of poloxamer 188 and 5% sucrose.
- 4.6 Dependent claims not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, involve an inventive step because the features are considered to be generally known by the person skilled in the art or have been disclosed in D1, D2 or D3 :
- 4.6.1 the addition of a known adjuvant is considered to be obvious for the person skilled in the art
- 4.6.2 the use of a plurality of inactivated Dengue viruses and the doses to be used are disclosed in D1 and D3 and the addition of chimeric dengue viruses or other flaviviruses is considered to be an obvious modification.
- 4.7 The present application does therefore not satisfy the criterion set forth in Article 33(3) PCT and the subject - matter of claims 1-8,18-20,50-67,84-86 (completely) and 9-17,21-49,68-83,87-119 (partially) (see subject 1) does not involve an inventive step (Rule 65(1)(2) PCT).
- 5 SUPPORT (ART. 6PCT)
- 5.1 Present claims relate to all immunogenic compositions immunogenic compositions comprising a purified inactivated Dengue virus, any buffer and any poloxamer surfactant. Support within the meaning of Article 6 PCT is to be found, however, for only a very small proportion of these immunogenic compositions claimed. In the present case, the claims lack support, and the application lacks disclosure. Consequently, the claims need to be restricted to the subject-matter that is considered to be sufficiently supported namely immunogenic compositions comprising a purified inactivated dengue virus, a phosphate or Tris buffer at pH above neutral, 0.001%-0.2% of poloxamer 188 and 5% sucrose since for these compositions a favourable stability and immunogenicity has been demonstrated.

INVENTION 2 :

6 NOVELTY (Art. 33(2) PCT)

6.1 The present application satisfies the criterion set forth in Article 33(2) PCT because the subject - matter of claims 9-17,21-49,68-83,87-119 (partially)(see subject 2) is new in respect of prior art as defined in the regulations (Rule 64 (1) - (3) PCT).

7 INVENTIVE STEP (Art. 33(3) PCT)

7.1 For inventive step analysis of claim 9, D5 is considered to represent the most relevant state of the art and discloses an immunogenic composition comprising a purified inactivated dengue virus, a buffer and an aluminum salt (see page 4443, column 2, paragraph 1 and page 4444. column 1, paragraph 4). The subject - matter of claim 1 differs in that an immunogenic composition further comprising a surfactant is claimed is claimed.

7.2 The problem to be solved by the subject matter of claim 1 may therefore be regarded as the provision of an alternative immunogenic composition. The solution would be an immunogenic composition comprising a purified inactivated dengue virus, a buffer, an aluminum salt and a surfactant.

7.3 This solution cannot however be considered as involving an inventive step because the use of surfactants in the formulation of vaccines is generally known by the person skilled and is disclosed in D6 and D7.

7.4 For the same reasons also the method of formulating the immunogenic composition of claim 68 is not considered to involve an inventive step.

7.5 Claims 118 and 119 are not considered to be inventive since these claims do not solve a problem since the present application does not provide any data on the reduction nonspecific adsorption and/or aggregation and on enhancing recovery for an immunogenic composition comprising an aluminum salt.

7.6 Dependent claims not appear to contain any additional features which, in combination with the features of any claim to which they refer, involve an inventive step because the features are considered to be generally known by the person skilled in the art or have been disclosed in the cited documents

7.6.1 the addition of a known adjuvant is considered to be obvious for the person skilled in the art

7.6.2 the use of a plurality of inactivated Dengue viruses and the doses to be used are disclosed in D1 and D3 and the addition of chimeric dengue viruses or other flaviviruses is considered to be an obvious modification.

- 7.7 The present application does therefore not satisfy the criterion set forth in Article 33(3) PCT and the subject - matter of claims 9-17,21-49,68-83, 87-119 (partially) (see subject 2) does not involve an inventive step (Rule 65(1)(2) PCT).
- 8 SUPPORT (ART. 6 PCT)
- 8.1 Present claims relate to all immunogenic compositions immunogenic compositions comprising a purified inactivated Dengue virus adsorbed onto an aluminum salt, any buffer and any surfactant. Support within the meaning of Article 6 PCT is to be found, however, for none of these immunogenic compositions claimed since the present application does not provide any data on immunogenic compositions comprising an aluminum salt.

VII. Certain defects (Continuation)

- 9 Contrary to the requirements of Rule 5.1(a)(ii) PCT, the relevant background art disclosed in documents D2-D7 is not mentioned in the description, nor are these documents identified therein.
- 10 If amendments are filed, it should be by way of replacement pages in the manner stipulated by Rule 66.8(a) PCT. In particular, fair copies of the amendments should be filed preferably in triplicate. Moreover, the applicant's attention is drawn to the fact that, as a consequence of Rule 66.8(a) PCT the examiner is not permitted to carry out any amendments under the PCT procedure, however minor these may be.
- 11 In order to facilitate the examination of the conformity of the amended application with the requirements of Article 34(2)(b) PCT, the applicant is requested to clearly identify the amendments carried out, no matter whether they concern amendments by addition, replacement or deletion, and to indicate the passages of the application as filed on which these amendments are based (see also Rule 66.8(a) PCT). If the applicant regards it as appropriate these indications could be submitted in handwritten form on a copy of the relevant parts of the application as filed.
- 12 The applicant is requested to note that in accordance with Rule 66.4 (a) PCT the issuance of an additional Written Opinion (WO) is facultative. Moreover, as the final action in the PCT procedure is an International **Preliminary** Examination Report (IPER) and not a decision, a violation of the right to be heard cannot exist. The applicant can not therefore rely on obtaining a second WO before the IPER is issued and is requested to answer this first WO in a complete manner.

VIII. Certain Observations (Continuation)

- 13 The application does not meet the requirements of Article 6 PCT because claims are not clear for the following reasons:
- 14 Claim 54 is not clear since this claim has a broader scope than claim 50 on which it depends.
- 15 Claim 55 seems to overlap completely with claim 50.
- 16 It appears from the description as a whole and in particular from the examples, that the presence of a buffer at pH above neutral, 0.001%-0.2% of poloxamer 188 and 5% sucrose is an essential technical feature of the present invention. These essential technical features are however not present in the independent claims. For these reasons the claims lack clarity according to Art. 6 PCT taken in combination with Rule 6.3 (b) PCT (see also PCT Preliminary Examination Guidelines III.4.3).

ANEXO

El documento que acredita la calidad de REPRESENTANTES LEGALES en Bogotá de los doctores **ALICIA LLORED**A y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ** para TODOS LOS ASUNTOS RELACIONADOS CON LA PROPIEDAD INDUSTRIAL de la sociedad peticionaria, que faculta a cada uno de dichos abogados para actuar individualmente, se está presentando con esta solicitud. En consecuencia, ruego a usted reconocer la personería de cada uno de dichos Representantes Legales para actuar dentro del presente expediente, a fin de que cualquiera de ellos pueda intervenir en cualquier tiempo respecto de la solicitud en él contenida.


ALICIA LLORED A RICAURTE

T.P. No. 53.215

TRADUCCION OFICIAL No. 2004-09-09-466
DE LAS PARTES PERTINENTES DE UN DOCUMENTO
PRESENTADO EN INGLES

PODER

Legalización de un Poder de Representación Legal, documento escrito en inglés y en español.

Certificado Notarial (Sociedad) documento también escrito en inglés y en español.

Notarización, documento escrito en español.

APOSTILLA

(Convención de La Haya del 5 de Octubre de 1961)

Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte

1. País: Reino Unido de la Gran Bretaña e Irlanda del Norte
- Este documento público
2. ha sido firmado James Kerr Milligan
3. actuando como Notario Público
4. lleva el sello/estampilla de dicho Notario Publico

CERTIFICADO

5. en Londres
6. el 01 de septiembre de 2004
7. por el Secretario de Estado Principal de Su Majestad para Asuntos Exteriores y del Commonwealth
8. Número: **G 749037**
9. Sello/Estampilla:
10. Firma: (ilegible)

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177


ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

NO SE ASUME
RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

2059

Anta Escobar
CIVIL ENGINEER
REGISTERED
IN THE PROVINCE OF
SOUTH AFRICA
SOUTH AFRICAN
COUNCIL OF ENGINEERS

SET TO ADULT

1. *Chrysomelidae*
 2. *Chrysomelidae*
 3. *Chrysomelidae*
 4. *Chrysomelidae*
 5. *Chrysomelidae*
 6. *Chrysomelidae*
 7. *Chrysomelidae*
 8. *Chrysomelidae*
 9. *Chrysomelidae*
 10. *Chrysomelidae*
 11. *Chrysomelidae*
 12. *Chrysomelidae*
 13. *Chrysomelidae*
 14. *Chrysomelidae*
 15. *Chrysomelidae*
 16. *Chrysomelidae*
 17. *Chrysomelidae*
 18. *Chrysomelidae*
 19. *Chrysomelidae*
 20. *Chrysomelidae*
 21. *Chrysomelidae*
 22. *Chrysomelidae*
 23. *Chrysomelidae*
 24. *Chrysomelidae*
 25. *Chrysomelidae*
 26. *Chrysomelidae*
 27. *Chrysomelidae*
 28. *Chrysomelidae*
 29. *Chrysomelidae*
 30. *Chrysomelidae*
 31. *Chrysomelidae*
 32. *Chrysomelidae*
 33. *Chrysomelidae*
 34. *Chrysomelidae*
 35. *Chrysomelidae*
 36. *Chrysomelidae*
 37. *Chrysomelidae*
 38. *Chrysomelidae*
 39. *Chrysomelidae*
 40. *Chrysomelidae*
 41. *Chrysomelidae*
 42. *Chrysomelidae*
 43. *Chrysomelidae*
 44. *Chrysomelidae*
 45. *Chrysomelidae*
 46. *Chrysomelidae*
 47. *Chrysomelidae*
 48. *Chrysomelidae*
 49. *Chrysomelidae*
 50. *Chrysomelidae*
 51. *Chrysomelidae*
 52. *Chrysomelidae*
 53. *Chrysomelidae*
 54. *Chrysomelidae*
 55. *Chrysomelidae*
 56. *Chrysomelidae*
 57. *Chrysomelidae*
 58. *Chrysomelidae*
 59. *Chrysomelidae*
 60. *Chrysomelidae*
 61. *Chrysomelidae*
 62. *Chrysomelidae*
 63. *Chrysomelidae*
 64. *Chrysomelidae*
 65. *Chrysomelidae*
 66. *Chrysomelidae*
 67. *Chrysomelidae*
 68. *Chrysomelidae*
 69. *Chrysomelidae*
 70. *Chrysomelidae*
 71. *Chrysomelidae*
 72. *Chrysomelidae*
 73. *Chrysomelidae*
 74. *Chrysomelidae*
 75. *Chrysomelidae*
 76. *Chrysomelidae*
 77. *Chrysomelidae*
 78. *Chrysomelidae*
 79. *Chrysomelidae*
 80. *Chrysomelidae*
 81. *Chrysomelidae*
 82. *Chrysomelidae*
 83. *Chrysomelidae*
 84. *Chrysomelidae*
 85. *Chrysomelidae*
 86. *Chrysomelidae*
 87. *Chrysomelidae*
 88. *Chrysomelidae*
 89. *Chrysomelidae*
 90. *Chrysomelidae*
 91. *Chrysomelidae*
 92. *Chrysomelidae*
 93. *Chrysomelidae*
 94. *Chrysomelidae*
 95. *Chrysomelidae*
 96. *Chrysomelidae*
 97. *Chrysomelidae*
 98. *Chrysomelidae*
 99. *Chrysomelidae*
 100. *Chrysomelidae*

Sello de la Oficina de Asuntos
Exteriores y del Commonwealth

W. Glass
Por el Secretario de Estado

Si este documento se va a usar en un país que no es parte de la Convención de La Haya del 5 de octubre de 1961, debe presentarse a la sección consular de la misión que representa a ese país. Una apostilla o certificado de legalización únicamente confirma que la firma, sello o estampilla sobre el documento es autentica. No significa que los contenidos del documento sean correctos o que la Oficina de Asuntos Exteriores y del Commonwealth apruebe los contenidos.

Traducido según mi mejor saber y entender, este día 9 de septiembre de 2004, en la ciudad de Bogotá, D.C., por Anita Escobar de Tamayo, Traductora Oficial, Res. 2177 de 1989, Ministerio de Justicia, República de Colombia.

TRADUCTOR OFICIAL
RESOLUCION 2177

Anita Escobar de Tamayo
ANITA ESCOBAR DE TAMAYO

Yo, el infrascrito, JAMES KERR MILLIGAN, Notario Público de la Ciudad de Londres, Inglaterra, por la Autoridad Real debidamente admitido y juramentado,

CERTIFICO:

QUE es auténtica la firma suscrita al pie del adjunto Poder, por ser del puño y letra del Señor Don MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON, cuya identidad me consta, Apoderado de la Sociedad denominada "GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A." (anteriormente denominada "Smithkline Beecham Biologicals s.a."), Sociedad legalmente constituida y existente de acuerdo con las leyes de Bélgica, con domicilio social en Rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart, Bélgica;

QUE el citado Señor Don MARCUS JONATHAN WILLIAM DALTON está debida y suficientemente autorizado para firmar documentos de esta clase, en virtud del Poder otorgado en su favor por la referida Sociedad fechado el 12 de junio de 2002, cuyo original he tenido a la vista.

Y QUE los objetos para los cuales se otorgó dicho Poder se encuentran dentro de los objetos o actividades de la citada Sociedad, de acuerdo con la Escritura Constitutiva y los Estatutos Sociales, los cuales he tenido a la vista.

Y PARA QUE CONSTE y obre los efectos conducentes expido la presente que firmo y sello en Londres, el día de hoy primero de septiembre del año dos mil cuatro.

JAMES KERR MILLIGAN
Notario Público de Londres, Inglaterra



APOSTILLE

(Hague Convention of 5 October 1961/Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. Country: United Kingdom of Great Britain and Northern Ireland
Pays: Royaume-Uni de Grande-Bretagne et d'Irlande du Nord

This public document/Le présent acte public

2. has been signed by a été signé par James Keef Milligan
3. acting in the capacity of agissant en qualité de Notary Public
4. bears the seal/stamp of est revêtu du sceau/timbre de Notary Public

Certified/Attesté

5. at London/à Londres 6. the/le 01 OCT 1961
7. by Her Majesty's Principal Secretary of State for Foreign and Commonwealth Affairs/
par le Secrétaire d'Etat Principal de Sa Majesté aux Affaires Etrangères et du Commonwealth.

8. Number/sous No G 749037

9. Stamp:
timbre:



10. Signature: W GLASS

W Glass

For the Secretary of State/ Pour le Secrétaire d'Etat

If this document is to be used in a country which is
not party to the Hague Convention of 5 October 1961,
it should be presented to the consular section of the
mission representing that country.

Los abajo firmados, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, una sociedad organizada y existente de conformidad con las leyes de Bélgica.

con domicilio en **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Bélgica**

nombramos por el presente a **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ**, domiciliados en Bogotá, Colombia, con oficinas en dicha ciudad, Calle 72 No. 5-83, piso 6o., nuestros representantes legales y verdaderos en Bogotá, con facultades para recibir notificaciones y nombrar apoderados judiciales o extrajudiciales, con el fin de dar cumplimiento al parágrafo 1o. del artículo 543 del decreto 410 de 1971.

Los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ**, o los apoderados que cualquiera de ellos designe, quedan especialmente facultados para representarnos ante las autoridades colombianas, administrativas, judiciales o de policía, en todos los trámites relativos a la propiedad industrial, a cuyo efecto les facultamos para dar ante dichas autoridades todos los pasos necesarios al objeto indicado; elevar solicitudes, declaraciones, reclamos, recursos y presentar desistimientos; formular descripciones, enmiendas, limitar el alcance de las solicitudes, presentar oposiciones y apelaciones; instaurar cancelaciones, renunciar total o parcialmente a los registros, abonar todos los impuestos y cuotas y efectuar todo otro pago determinado por la ley; recibir todos los documentos y valores, dando el descargo respectivo; llenar cualesquiera otros requisitos y tomar, en fin, todas las medidas que creyeren conducentes al resguardo de nuestros intereses; y en caso de producirse oposición, pasando los antecedentes a los tribunales, quedan facultados para tomar intervención como demandantes o demandados ante los jueces que sean competentes, pudiendo transar, someter a árbitros, desistir, percibir y apelar, con todas las demás facultades que resulten necesarias, y por el presente declaramos desde ahora válido y bueno cuanto dichos representantes y/o los apoderados que cualquiera de ellos nombre hicieren en nuestro beneficio.

Asimismo, facultamos a los doctores **ALICIA LLOREDA** y/o **GUSTAVO TAMAYO** y/o **IGNACIO SANTAMARIA** y/o **ENRIQUE ALVAREZ**, para solicitar en la Oficina de Propiedad Industrial la protocolización de este documento y de cualquier poder que cualquiera de ellos otorgue a nombre nuestro.

Dado y firmado

The undersigned, **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, a corporation organized and existing under the laws of Belgium.

domiciled at **rue de l'Institut 89,
B-1330 Rixensart,
Belgium**

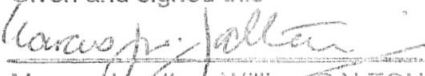
hereby appoint, **ALICIA LLOREDA** and/or **GUSTAVO TAMAYO** and/or **IGNACIO SANTAMARIA** and/or **ENRIQUE ALVAREZ**, of Bogotá, Colombia, with offices in said town, Calle 72 No. 5-83, Sixth Floor, our true and legal representatives in Bogotá, with power to receive notifications and to appoint judicial or extrajudicial agents, so as to comply with paragraph 1o. of article 543 of decree 410 of 1971.

Doctors **ALICIA LLOREDA** and/or **GUSTAVO TAMAYO** and/or **IGNACIO SANTAMARIA** and/or **ENRIQUE ALVAREZ**, or the agents by any one of them appointed, are especially empowered to represent us before the administrative, judicial or police authorities of Colombia, in all proceedings pertaining to industrial property, for which purpose we authorize them to take before the said authorities all the necessary steps for the said end; to file petitions, declarations, claims, recourses and withdrawals, to draw up specifications; to file amendments, to limit the scope of applications, file oppositions; file cancellations total or partially waive registrations, to pay all installments and effect all other payments prescribed by law; to receive proper receipts, to comply with all other requirements and, in short, to take all those measures which they may deem fit for the protection of our interests; and in case of opposition, where the proceedings be passed over to the courts, we authorize said agents to act on our behalf, as complainants as well as defendants, before the competent judges, with full powers to make arrangements, to submit to arbitrators, to desist, to collect, to appeal and, in short, with all such further powers as may be required, and we hereby declare from now on as valid and good all that said representatives and/or the agents by any one of them appointed may do for our benefit.

We also authorize doctors **ALICIA LLOREDA** and/or **GUSTAVO TAMAYO** and/or **IGNACIO SANTAMARIA** and/or **ENRIQUE ALVAREZ**, to apply for protocolization of this document and of any power of attorney by any one of them conferred in our name, before the Office of Industrial Property.

31 AUG 2004

Given and signed this


Marcus Jonathan William DALTON
Attorney and Authorised Official

NOTARY SHOULD EXECUTE OTHER SIDE



CERTIFICADO NOTARIAL (SOCIEDAD)

Bélgica

{ss

Hoy de de 200 , compareció , a quien conozco y de quien me consta que firmó el anterior documento, y quien debidamente juramentado declaró y dijo que él es de **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, la compañía nombrada en el documento que antecede, una sociedad debidamente organizada y existente conforme a las leyes de **Bélgica**, domiciliada en la ciudad de **Rixensart, Bélgica**, legalmente constituida para un período de duración que aún no ha terminado, que ejerce su objeto social; conforme a las leyes de

que el declarante está autorizado por dicha Compañía para conferir este poder; que el sello estampado por él al pie de tal poder, en nombre y en representación de la expresada Compañía, es el sello oficial de ella; y que el objeto para el cual se confiere este instrumento está comprendido dentro del de la sociedad.

El suscrito Notario ha visto los Estatutos de incorporación firmados en

con fecha , y certifica que de conformidad con la legislación de dicho País, la anterior declaración juramentada es prueba suficiente de que los hechos sobre que ella versa son ciertos o verdaderos, de lo cual da fe.

Notary Public (Notario Público).

NOTARIAL CERTIFICATE (CORPORATION)

Belgium

{ss

On this day of , 200 , personally came to me known, and known to me to be the person who signed the foregoing instrument, who being by me duly sworn did depose and say that he is the

of **GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A.**, the company named within, a Corporation organized and existing under the laws of the **Belgium**, domiciled at the City of **Rixensart, Belgium**, legally constituted for a period of tenure not yet expired, which exercises its corporate purposes according to the laws of

, that the deponent is authorized by said Company to confer this power of attorney; that the seal affixed hereunto by the deponent in the name and on behalf of said Corporation is the corporate seal thereof; and that the purpose for which this instrument is granted is included within the corporate purposes of the Company.

The undersigned Notary Public has seen the articles of Incorporation of said Corporation executed at , under date of

and hereby certifies that under the laws of said Country the foregoing acknowledgment is sufficient proof that the facts therein contained are true, which he attests.



- (51) **International Patent Classification:**
A61K 39/12 (2006.01) *A61K 47/10* (2006.01)
- (21) **International Application Number:**
PCT/EP2012/059879
- (22) **International Filing Date:**
25 May 2012 (25.05.2012)
- (25) **Filing Language:** English
- (26) **Publication Language:** English
- (30) **Priority Data:**
61/490,205 26 May 2011 (26.05.2011) US
61/570,966 15 December 2011 (15.12.2011) US
- (71) **Applicant (for all designated States except US):** **GLAXO-SMITHKLINE BIOLOGICALS SA** [BE/BE]; rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (72) **Inventors; and**
- (75) **Inventors/Applicants (for US only):** **HENDERICKX, Veronique** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals SA, rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **LE BUSSY, Olivier** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals SA, rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **LEMOINE, Dominique, Ingrid** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals SA, rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE). **MATHOT, Frederic** [BE/BE]; GlaxoSmithKline Biologicals SA, rue de l'Institut 89, B-1330 Rixensart (BE).
- (74) **Agent:** **DALTON, Marcus, Jonathan, William**; GlaxoSmithKline, Global Patents CN925.1, 980 Great West Road, Brentford Middlesex TW8 9GS (GB).

- (81) **Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available):** AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.
- (81) **Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available):** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), European (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Declarations under Rule 4.17:

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

Published:

- *with international search report (Art. 21(3))*

(54) **Title:** INACTIVATED DENGUE VIRUS VACCINE

(57) **Abstract:** The present invention provides formulations of an immunogenic composition containing a purified inactivated Dengue virus, and method for producing them.



PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference MJD/VU64649	FOR FURTHER ACTION see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.	
International application No. PCT/EP2012/059879	International filing date (day/month/year) 25/05/2012	(Earliest) Priority Date (day/month/year) 26/05/2011
Applicant GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS SA		

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

This international search report consists of a total of 6 sheets.

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

1. Basis of the report

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

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

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

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

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

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

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

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

INACTIVATED DENGUE VIRUS VACCINE

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

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

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

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

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/EP2012/059879

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

see additional sheet

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/059879

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV. A61K39/12 A61K47/10
ADD.

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)

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 practicable, search terms used)

EPO-Internal

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 2010/094663 A1 (GLAXOSMITHKLINE BIOLOG SA [BE]; BARAS BENOIT [BE]; GHEYSEN DIRK [BE];) 26 August 2010 (2010-08-26) cited in the application paragraphs [0010], [0020], [0025], [0031], [0038], [0040] - [0044], [0048] - [0051], [0066], [0072]; examples 1-3 -----	1-119
Y	SULI J ET AL: "Experimental squalene adjuvant - I. Preparation and testing of its effectiveness", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 22, no. 25-26, 3 September 2004 (2004-09-03), pages 3464-3469, XP004526924, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2004.02.023 the whole document ----- -/-	1-119



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family 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 application or patent but published on or after the international filing date

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

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

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

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

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

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

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

29 August 2012

Date of mailing of the international search report

06/09/2012

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Noë, Veerle

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No

PCT/EP2012/059879

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	US 6 254 873 B1 (PUTNAK J ROBERT [US] ET AL) 3 July 2001 (2001-07-03) abstract column 5, line 56 - column 6, line 57 examples 3,4 -----	1-119
A	US 2008/248551 A1 (STINCHCOMB DAN T [US] ET AL) 9 October 2008 (2008-10-09) claims 1,8,12; examples 1-3 -----	1-119
Y	ROBERT PUTNAK J ET AL: "An evaluation of dengue type-2 inactivated, recombinant subunit, and live-attenuated vaccine candidates in the rhesus macaque model", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 23, no. 35, 15 August 2005 (2005-08-15), pages 4442-4452, XP027651869, ISSN: 0264-410X [retrieved on 2005-08-15] abstract page 4443, column 2, paragraph 1 page 4444, column 1, paragraph 4 -----	9-17, 21-49, 68-83, 87-119
Y	ASCARATEIL S ET AL: "Surfactants in vaccine adjuvants: description and perspectives", VACCINE, ELSEVIER LTD, GB, vol. 24, 12 April 2006 (2006-04-12), pages S83-S85, XP028010943, ISSN: 0264-410X, DOI: 10.1016/J.VACCINE.2005.01.134 [retrieved on 2006-04-12] the whole document -----	9-17, 21-49, 68-83, 87-119
Y	NEWMAN M J ET AL: "USE OF NONIONIC BLOCK COPOLYMERS IN VACCINES AND THERAPEUTICS", CRITICAL REVIEWS IN THERAPEUTIC DRUG CARRIER SYSTEMS, BEGELL HOUSE PUBLISHING INC, US, vol. 15, no. 2, 1 January 1998 (1998-01-01), pages 89-142, XP009002052, ISSN: 0743-4863 abstract page 101, paragraph 3 page 102, paragraph 3 - page 107 -----	9-17, 21-49, 68-83, 87-119
Y	US 2011/014233 A1 (KOCHEL TADEUSZ J [US] ET AL) 20 January 2011 (2011-01-20) paragraph [0043] -----	9-17, 21-49, 68-83, 87-119

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No

PCT/EP2012/059879

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2010094663	A1	26-08-2010	AR 075437 A1 30-03-2011
			AU 2010215595 A1 25-08-2011
			CA 2752809 A1 26-08-2010
			CN 102395600 A 28-03-2012
			EP 2398821 A1 28-12-2011
			KR 20110132379 A 07-12-2011
			PE 09922011 A1 12-02-2012
			SG 173194 A1 29-09-2011
			TW 201043245 A 16-12-2010
			US 2011318407 A1 29-12-2011
			UY 32457 A 31-01-2011
			WO 2010094663 A1 26-08-2010

US 6254873	B1	03-07-2001	NONE

US 2008248551	A1	09-10-2008	AU 2008279576 A1 29-01-2009
			CA 2720570 A1 29-01-2009
			CN 101679954 A 24-03-2010
			CO 6260150 A2 22-03-2011
			CU 20090169 A7 21-06-2012
			EP 2144998 A1 20-01-2010
			JP 2010523127 A 15-07-2010
			KR 20100016294 A 12-02-2010
			US 2008248551 A1 09-10-2008
			WO 2009014774 A1 29-01-2009

US 2011014233	A1	20-01-2011	NONE

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCT/ISA/ 210

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

1. claims: 1-8, 18-20, 50-67, 84-86(completely); 9-17, 21-49, 68-83, 87-119(partially)

immunogenic composition comprising one or more purified inactivated Dengue viruses, a buffering agent and a poloxamer surfactant.

2. claims: 9-17, 21-49, 68-83, 87-119(all partially)

immunogenic composition comprising one or more purified inactivated Dengue viruses adsorbed onto an aluminium salt , a buffering agent and a surfactant.

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____													
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 26-11-13 (51) Clasificación Internacional: A61K 39/12 (71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (72)Inventor(es): HENDERICKX, Veronique; LE BUSSY, Olivier; LEMOINE, Dominique, Ingrid y MATHOT, Frederic. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE <table><tr><td>(30) Prioridad</td><td>(31) No. Prioridad</td><td>(32) Fecha</td><td>(33) País</td></tr><tr><td></td><td>61/490,205</td><td>26-05-11</td><td>US</td></tr><tr><td></td><td>61/570,966</td><td>15-12-11</td><td>US</td></tr></table> (85) Fecha límite inicio fase nacional: 26-12-13 (86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT Fecha de presentación de la solicitud: 25-05-12 No. de solicitud: PCT/EP2012/059879 (87) Publicación internacional: Fecha: 29-11-12 No. Publicación: WO 2012/160199 A1		(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País		61/490,205	26-05-11	US		61/570,966	15-12-11	US
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País										
	61/490,205	26-05-11	US										
	61/570,966	15-12-11	US										
(54) Título: VACUNA DE VIRUS DE DENGUE INACTIVADO.													
(57) Resumen - Reivindicación(es): Resumen.- La presente invención proporciona formulaciones de una composición inmunogénica que contiene un virus de Dengue inactivado purificado, y un método para su producción. Sector: Inmunología. Composición inmunológica para prevención de la infección por virus de dengue.													

 SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS PATENTE DE INVENCION ____ PCT <u>X</u> MODELO DE UTILIDAD ____ DISEÑO INDUSTRIAL ____													
(21) No. de solicitud: (22) Fecha de solicitud: 26-11-13 (51) Clasificación Internacional: A61K 39/12 (71) Solicitante(s): GLAXOSMITHKLINE BIOLOGICALS S.A. (72) Inventor(es): HENDERICKX, Veronique; LE BUSSY, Olivier; LEMOINE, Dominique, Ingrid y MATHOT, Frederic. (74) Apoderado: ALICIA LLOREDA RICAURTE <table><tr><td>(30) Prioridad</td><td>(31) No. Prioridad</td><td>(32) Fecha</td><td>(33) País</td></tr><tr><td></td><td>61/490,205</td><td>26-05-11</td><td>US</td></tr><tr><td></td><td>61/570,966</td><td>15-12-11</td><td>US</td></tr></table> (85) Fecha límite inicio fase nacional: 26-12-13 (86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT Fecha de presentación de la solicitud: 25-05-12 No. de solicitud: PCT/EP2012/059879 (87) Publicación internacional Fecha: 29-11-12 No. publicación: WO 2012/160199 A1		(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País		61/490,205	26-05-11	US		61/570,966	15-12-11	US
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País										
	61/490,205	26-05-11	US										
	61/570,966	15-12-11	US										
(54) Título: VACUNA DE VIRUS DE DENGUE INACTIVADO.													