TÍTULO DE LA INVENCIÓN

FORMULACIONES DE COMPOSICIONES DE VACUNA CONTRA EL VIRUS DEL DENGUE

CAMPO DE LA INVENCIÓN

La presente invención se refiere a formulaciones de vacuna contra el virus del dengue que comprenden al menos un virus del dengue vivo atenuado o flavivirus quimérico vivo atenuado, un amortiguador, un azúcar, un derivado de celulosa y un alcohol de azúcar o glicol, y opcionalmente un aminoácido y un álcali o sal alcalina; y formulaciones de vacuna contra el virus del dengue que comprenden al menos un virus del dengue vivo atenuado o flavivirus quimérico vivo atenuado, un amortiguador, un azúcar de al menos 150 mg/ml, un portador, y opcionalmente un álcali o sal alcalina, o un álcali o sal alcalina y un aminoácido.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

La familia Flaviviridae incluye el virus prototipo de la fiebre amarilla (YF), los cuatro serotipos del virus del dengue (DENV-1, DENV-2, DENV-3, y DENV-4), virus de la encefalitis japonesa (JE), virus de encefalitis transmitida por garrapatas (TBE), virus del Nilo Occidental (WN), virus de encefalitis de San Luis (SLE), y alrededor de otros 70 virus que causan enfermedades. Los *Flavivirus* son virus envueltos y pequeños que contienen un genoma de ARN monocatenario de sentido positivo. Se codifican diez productos génicos mediante un marco de lectura abierto único y se traducen como una poliproteína organizada en el siguiente orden: cápside (C), “preMembrana” (prM, la cual se procesa a “Membrana” (M) justo antes de la liberación de viriones de la célula), “envoltura” (E), y luego las proteínas no estructurales (NS) NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b y NS5 (analizadas en Chambers, T. J. *et al.*, *Annual Rev Microbiol* (1990) 44:649-688; Henchal, E. A. y Putnak, J. R., *Clin Microbiol Rev.* (1990) 3:376-396). Las proteínas individuales de los flavivirus se producen entonces a través de eventos de procesamiento precisos mediados por el huésped y proteasas viralmente codificadas.

La envoltura de los flavivirus se deriva de la membrana celular huésped y contiene la membrana (M) anclada a la membrana viralmente codificada y glucoproteínas de envoltura (E). La glucoproteína de E es la proteína estructural viral más grande y contiene dominios funcionales responsables de la unión de la superficie celular y actividades de fusión intraendosomales. También es un gran objetivo del sistema inmunitario huésped, al inducir la producción de anticuerpos que neutralizan virus, que se asocian a la inmunidad protectora.

Los virus del dengue se transmiten al ser humano a través de mosquitos del género *Aedes*, principalmente *A. aegypti* y *A. albopictus.* La infección por virus del dengue genera un cuadro clínico diverso que va desde una enfermedad asintomática o febril leve, una fiebre por dengue (DF) clásica, hasta una fiebre hemorrágica por dengue /síndrome de choque

por dengue (DHF/DSS). La fiebre por dengue se caracteriza por fiebre alta, dolor de cabeza, dolor muscular y de las articulaciones, sarpullido, linfadenopatía y leucopenia (Gibbons, R. V. y D. W. Vaughn, *British Medical Journal* (2002) 324:1563-1566). DHF/DSS es una forma más grave de infección, más común en niños, marcada por permeabilidad vascular y/o manifestaciones hemorrágicas graves que van desde la presencia de petequias y equimosis hasta hemorragia espontánea grave y choque intenso. Sin un diagnóstico y una rápida intervención médica, la pronta aparición y rápida progresión de DHF/DSS puede ser fatal si no se trata.

Los virus del dengue conforman el grupo más significativo de virus transmitidos por artrópodos en términos de morbilidad y mortalidad globales con una estimación de cien millones de infecciones por dengue por año, que incluye al menos 36 millones de casos de fiebre por dengue y 250.000 a 500.000 casos de DHF/DSS (Gubler, D. J., *Clin. Microbiol. Rev.* (1998) 11:480-496; Gibbons, *supra*). Con el aumento global de la población, la urbanización de la población, en especial en los trópicos, y la falta de medidas de control del mosquito sostenidas, los mosquitos vectores del dengue expandieron su distribución en los trópicos, subtrópicos, y algunas áreas templadas, causando un riesgo de infección por dengue a más de la mitad de la población mundial. Los viajes modernos en jet y la emigración de seres humanos facilitaron la distribución global de serotipos de dengue, de modo que múltiples serotipos de dengue ahora son endémicos en muchas regiones. Hubo un aumento en la frecuencia de epidemias de dengue y en la incidencia de DHF/DSS en los últimos 20 años o más. Por ejemplo, en el Sudeste Asiático, DHF/DSS es una causa principal de hospitalización y muerte entre los niños (Gubler, *supra*; Gibbons y Vaughn, *supra*).

Hasta la fecha, el desarrollo de vacunas contra los flavivirus se logró con éxito mixto. Existen cuatro enfoques básicos que se implementaron en un esfuerzo de producir candidatos de vacuna para la protección contra enfermedades causadas por los flavivirus: vacunas de virus completo inactivadas, vivas atenuadas, de proteína de subunidad recombinante, y a base de ADN. Desde hace décadas está disponible una vacuna viva atenuada contra el virus de la fiebre amarilla y, más recientemente, se registró una vacuna viva atenuada contra la encefalitis japonesa en varios países del mundo. Se demostró el uso de vacunas de virus completos inactivados contra los virus de TBE y JE con diversos productos registrados disponibles. Heinz *et al.* Flavivirus y flavivirus vaccines. *Vaccine* 30: 4301-06 (2012).

A pesar del éxito de las vacunas contra YF, JE y TBE mencionadas anteriormente, el uso de métodos con virus vivos atenuados y virus inactivados para desarrollar vacunas contra el virus del dengue se encontró con desafíos significativos. Existen cuatro serotipos del virus del dengue (DENV1, DENV2, DENV3, y DENV4) y se encuentran circulando cadenas de cada serotipo en las regiones endémicas de dengue del mundo. La infección natural confiere una inmunidad de larga duración al serotipo infectante

pero no así a otros serotipos de dengue. Las formas más graves de la enfermedad (DHF/DSS) ocurren con mayor frecuencia después de una infección por dengue secundaria, cuando a la infección con un serotipo de virus del dengue le sigue una segunda infección con otro serotipo. La hipótesis de la asociación más frecuente de DHF y DSS con una infección por dengue secundaria se planteó debido a los anticuerpos no neutralizantes inducidos por la infección con un tipo de virus que mejora la infectividad de un segundo tipo de virus del dengue (mejora dependiente de anticuerpo – ADE).

Hasta la fecha, la mayoría de las vacunas evaluadas clínicamente son vacunas vivas atenuadas. También se está analizando el uso de candidatos de vacuna no replicativa. Por ejemplo, Ivy *et al*. (patente estadounidense Nº 6.432.411) divulgan una vacuna de subunidades tetravalente que comprende 80 % de las proteínas de E (la región de péptidos de DEN1-4 que corresponde a los aminoácidos 1-395 del polipéptido de envoltura de DENV-2) de DEN1-4. Ivy et al, *supra*, también informan composiciones que comprenden 80 % de E de DENV 1-4 y adyuvante ISCOMATRIX®. Coller *et al*. (WO 2012/154202) divulgan formulaciones tetravalentes que comprenden 80% de E de DEN 1-4. Los virus inactivados también se pueden usar como potenciales candidatos de vacuna o como componentes de una vacuna eficaz (Putnak et al. *Vaccine* 23: 4442–4452 (2005), US 6190859, US 6254873 y Sterner *et al*. WO 2007/002470). Las composiciones que comprenden una vacuna viva atenuada contra el virus del dengue y vacuna contra el dengue no replicativa se divulgan en la solicitud de patente internacional N.º PCT/US14/042625 (WO2014/204892).

Los virus completos son uno de los antígenos más comúnmente usados en diversos productos vacunales debido a su capacidad para generar respuestas inmunitarias humorales y celulares. Los productos vacunales que contienen virus completos implican un desafío para poder estabilizarlos puesto que son sensibles al calor, congelamiento/descongelamiento y otros tipos de esfuerzo de procesamiento que producen pérdidas de potencia significativas. Estos productos, en general, se almacenan congelados (por debajo de -20 °C) o como polvo seco. Los productos congelados no son fáciles de almacenar y distribuir puesto que necesitan un riguroso requisito de cadena de frío para evitar la pérdida de potencia. Generalmente, el secado de virus completos, en especial, virus envueltos, genera una pérdida de potencia significativa debido a los esfuerzos de congelamiento y secado producidos durante el proceso de secado. Por lo tanto, existe la necesidad en el estado de la técnica de generar formulaciones estables del virus del dengue.

SUMARIO DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona formulaciones estables de vacunas contra el dengue vivas atenuadas. La adición de un derivado de celulosa y un alcohol de azúcar o glicol mejoró la estabilidad y/o el rendimiento después del secado. De manera alternativa, la adición

de azúcar de al menos 150 mg/ml mejoró la estabilidad y/o el rendimiento después del secado por microondas.

En un aspecto, la invención proporciona una formulación que comprende una vacuna contra el dengue viva atenuada que comprende al menos un virus vivo atenuado (LAV) del dengue o al menos un flavivirus quimérico vivo atenuado (LACV), un amortiguador a pH alrededor de 6,5 a 8,5, un azúcar, un glicol o alcohol de azúcar, y un derivado de celulosa seleccionado del grupo que consiste en carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), 2-hidroxietilcelulosa (2-HEC), croscarmelosa, y metilcelulosa, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico; opcionalmente un álcali o sal alcalina, y opcionalmente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro o Glu, o una combinación de estos.

En una forma de realización, el amortiguador se selecciona del grupo que consiste en succinato, histidina, fosfato, TRIS, Bis-Tris, MES, MOPS, HEPES, acetato y citrato, o una combinación de estos. En otra forma de realización, el álcali o sal alcalina es cloruro de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o una combinación de estos. En otra forma de realización, el azúcar es trehalosa o sacarosa. En una forma de realización, el derivado de celulosa es una sal aceptable desde el punto de vista farmacéutico de carboximetilcelulosa. En otra forma de realización, el glicol se selecciona del grupo que consiste en propilenglicol, polipropilenglicol, etilenglicol, polietilenglicol, y monometiléteres de polietilenglicol. En otra forma de realización, el alcohol de azúcar es glicerol.

En otro aspecto, la formulación comprende una vacuna contra el dengue viva atenuada que comprende al menos un virus vivo atenuado (LAV) del dengue o al menos un flavivirus quimérico vivo atenuado en alrededor de 100-10.000.000 pfu/ml, un amortiguador a pH alrededor de 6,5 a 8,5, alrededor de 50-300 mg/ml de azúcar, alrededor de 2,5-10,0 mg/ml de propilenglicol (PG) o glicerol, y alrededor de 0,3-10 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio (CMC de sodio), opcionalmente alrededor de 10-150 mM de NaCl, y opcionalmente alrededor de 10-100 mM de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro o Glu, o una combinación de estos; una vacuna contra el dengue viva atenuada en alrededor de 100-100.000 pfu/ml, alrededor de 5-300 mM de amortiguador de histidina, TRIS, Bis-Tris o fosfato, o una combinación de estos a pH alrededor de 7,0 a 8,0, alrededor de 50-300 mg/ml de azúcar, alrededor de 3-10 mg/ml de propilenglicol o glicerol, y alrededor de 3-10 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, opcionalmente alrededor de 15-75 mM de NaCl, y, opcionalmente, alrededor de 10-75 mM de aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro o Glu, o una combinación de estos; una vacuna contra el dengue viva atenuada en alrededor de 600-20.000 pfu/ml, alrededor de 5-300 mM de amortiguador de fosfato de potasio a pH alrededor de 7,0-8,0, alrededor de 60-120 mg/ml de sacarosa o trehalosa o una combinación de estos, alrededor de 3-7 mg/ml de propilenglicol o glicerol, y alrededor de 3-7 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio con peso molecular

promedio de alrededor de 90.000, y alrededor de 30-90 mM de NaCl, y, opcionalmente, alrededor de 10-75 mM de aminoácido Leu, Lys o Glu, o una combinación de estos; una vacuna contra el dengue viva atenuada en alrededor de 600-20.000 pfu/ml, alrededor de 11 mM de amortiguador de fosfato de potasio a pH alrededor de 7,0-8,0, alrededor de 90 mg/ml de sacarosa, alrededor de 5 mg/ml de propilenglicol o glicerol, alrededor de 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio con peso molecular promedio de alrededor de 90.000, y alrededor de 75 mM de NaCl; una vacuna contra el dengue viva atenuada en alrededor de 600-20.000 pfu/ml, alrededor de 11 mM de amortiguador de fosfato de potasio a pH alrededor de 7,0-8,0, alrededor de 90 mg/ml de sacarosa, alrededor de 5 mg/ml de propilenglicol, alrededor de 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio con peso molecular promedio de alrededor de 90.000, alrededor de 50 mM de NaCl, y alrededor de 25 mM de Leu; una vacuna contra el dengue viva atenuada en alrededor de 600-20.000 pfu/ml, alrededor de 11 mM de amortiguador de fosfato de potasio a pH alrededor de 7,5, alrededor de 90 mg/ml de sacarosa, alrededor de 5 mg/ml de propilenglicol, alrededor de 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio con peso molecular promedio de alrededor de 90.000, y alrededor de 30 mM de NaCl. En un aspecto de las formas de realización anteriores, la formulación también comprende alrededor de 90-200 mg/ml de trehalosa.

En una forma de realización preferida de la invención, la formulación comprende una vacuna contra el dengue viva atenuada que comprende al menos un virus vivo atenuado (LAV) del dengue o al menos un flavivirus quimérico vivo atenuado en alrededor de 600-20.000 pfu/ml, alrededor de 11 mM de amortiguador de fosfato de potasio a pH alrededor de 7,5-8, alrededor de 90 mg/ml de sacarosa, alrededor de 110 mg/ml de trehalosa, alrededor de 5 mg/ml de propilenglicol, alrededor de 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio con peso molecular promedio de alrededor de 90.000, alrededor de 50 mM de NaCl, y alrededor de 25 mM de Leu. En un aspecto de las formas de realización anteriores, la formulación también comprende un tensioactivo seleccionado de poloxámero 188 y poloxámero 407 a alrededor de 0,0001 a 5 % p/v.

La invención también proporciona una formulación que comprende una vacuna contra el dengue viva atenuada que comprende al menos un virus vivo atenuado (LAV) del dengue o al menos un flavivirus quimérico vivo atenuado en alrededor de 100-10.000.000 pfu/ml, un amortiguador a pH alrededor de 6,5 a 8,5, un azúcar en alrededor de 150-300 mg/ml, un portador seleccionado del grupo que consiste en polivinilpirrolidona (PVP), carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), 2-hidroxietilcelulosa (2-HEC), croscarmelosa, metilcelulosa, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico, albúmina de suero humano (HSA) y gelatina; opcionalmente, un álcali o sal alcalina en alrededor de 5-100 mM; opcionalmente un aminoácido Gln, Pro o Glu, o una combinación de estos.

En una forma de realización, el amortiguador se selecciona del grupo que consiste en succinato, histidina, fosfato, TRIS, Bis-Tris, MES, MOPS, HEPES, acetato y citrato, o una

combinación de estos. En otra forma de realización, el álcali o sal alcalina es cloruro de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o una combinación de estos. En otra forma de realización, el azúcar es trehalosa o sacarosa, o una combinación de estas. En una forma de realización, la relación de sacarosa con respecto a trehalosa es entre 1:1 a 1:4. En otra forma de realización, el portador es una carboximetilcelulosa de sodio, HPMC, HSA o gelatina.

En otro aspecto, la invención proporciona formulaciones de una vacuna contra el dengue viva atenuada que comprende al menos un virus vivo atenuado (LAV) del dengue o al menos un flavivirus quimérico vivo atenuado en alrededor de 200-100.000 pfu/ml, un amortiguador a pH alrededor de 6,5-8,0, alrededor de 150-300 mg/ml de azúcar como una combinación de sacarosa y trehalosa, alrededor de 0,3 a 40 mg/ml de CMC de sodio, HSA, HPMC o gelatina, opcionalmente, alrededor de 10-100 mM de álcali o sal alcalina, y opcionalmente, alrededor de 5-25 mM de ácido glutámico; una vacuna contra el dengue viva atenuada en alrededor de 600-20.000 pfu/ml, alrededor de 5-300 mM de amortiguador de histidina, TRIS o fosfato, o una combinación de estos a pH alrededor de 7,0 a 8,0, alrededor de 50-100 mg/ml de sacarosa, alrededor de 90-200 mg/ml de trehalosa, alrededor de 0,3-10 mg/ml de CMC de sodio o alrededor de 10-40 mg/ml de gelatina, y alrededor de 30-90 mM de álcali o sal alcalina; una vacuna contra el dengue viva atenuada en alrededor de 600-20.000 pfu/ml, alrededor de 5-20 mM de fosfato de potasio a pH alrededor de 7-8, alrededor de 75 mg/ml de sacarosa, alrededor de 175 mg/ml de trehalosa, alrededor de 5 mg/ml de CMC de sodio con peso molecular promedio de alrededor de 90.000, y alrededor de 30 mM de NaCl; una vacuna contra el dengue viva atenuada en alrededor de 600-20.000 pfu/ml, alrededor de 5-20 mM de fosfato de potasio a pH alrededor de 7,0-8,0, alrededor de 75 mg/ml de sacarosa, alrededor de 175 mg/ml de trehalosa, alrededor de 25 mg/ml de gelatina, y alrededor de 30 mM de NaCl; una vacuna contra el dengue viva atenuada en alrededor de 600-20.000 pfu/ml, alrededor de 5-20 mM de fosfato de potasio a pH alrededor de 7,0-8,0, alrededor de 250 mg/ml de sacarosa, y alrededor de 50 mg/ml de PVP K12. En un aspecto de las formas de realización anteriores, la formulación también comprende un tensioactivo seleccionado de poloxámero 188 y poloxámero 407 a alrededor de 0,0001 a 5 % p/v.

En determinados aspectos de las formas de realización anteriores, la formulación también comprende un adyuvante de aluminio. Las formulaciones anteriores se pueden congelar o liofilizar, o reconstituir en solución. En una forma de realización, la reconstitución se lleva a cabo con alrededor de 0,5-1,0 ml de solución salina, agua o agua bacteriostática para inyección (BWFI) y, opcionalmente, un diluyente que comprende un adyuvante de aluminio. En otra forma de realización, la formulación es la solución acuosa antes de la liofilización o secado al vacío por microondas.

En una forma de realización, la vacuna contra el dengue viva atenuada comprende un virus tetravalente vivo atenuado del dengue o flavivirus quimérico vivo atenuado. En otra forma de realización, el LAV o el LACV comprende un genoma viral que contiene una

eliminación de alrededor de 30 nucleótidos que corresponden a la estructura tallo-bucle TL-2 de la región no traducida (UTR) 3'; lo cual reduce la capacidad replicativa del virus. En otra forma de realización, el virus vivo atenuado del dengue es un LAV que comprende un genoma viral que contiene una eliminación de alrededor de 30 nucleótidos que corresponde a la estructura tallo-bucle TL-2 de la región no traducida (UTR) 3', y es inmunógeno contra el serotipo de dengue 3, en donde el genoma viral del LAV también contiene una eliminación de nucleótidos corriente arriba de la eliminación Δ30 que corresponde a la estructura TL-3 de la UTR 3'.

En formas de realización preferidas de la invención, la vacuna contra el dengue viva atenuada es una vacuna tetravalente viva atenuada que comprende un virus DEN1Δ30, un virus DEN2/4Δ30 (un DEN2 Δ30LACV en una estructura principal de DEN4), un virus DEN3Δ30 y un virus DEN4Δ30. En otra forma de realización preferida, el virus vivo atenuado del dengue es un LAV que comprende rDEN1Δ30-1545, rDEN2/4Δ30 (ME)-1495,7163, rDEN3Δ30/31-7164, y rDEN4Δ30-7132,7163,8308.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

Figura 1: Efecto de CMC de sodio, PG, aminoácidos en el rendimiento de liofilización de DENV4 para formulaciones de DEN4.

Figura 2: Efecto de CMC de sodio, PG, aminoácidos en la estabilidad de DENV4 para formulaciones de DEN4. La Formulación 26 (*) no se evaluó debido a colapso de torta después de almacenamiento a 25 °C.

Figura 3: Efecto del alcohol de azúcar en el rendimiento de liofilización de DENV4 para formulaciones de DEN4.

Figura 4: Efecto del alcohol de azúcar en la estabilidad de DENV4 para formulaciones de DEN4.

Figura 5: Efecto del pH en el rendimiento de liofilización de DENV4 para formulaciones de DEN4.

Figura 6: Efecto del pH en la estabilidad de DENV4 para formulaciones de DEN4.

Figura 7: Efecto del amortiguador en el rendimiento de liofilización de DENV4 para formulaciones de DEN4.

Figura 8: Efecto del amortiguador en la estabilidad de DENV4 para formulaciones de DEN4.

Figura 9: Efecto de la concentración de NaCl en el rendimiento de liofilización de DENV4 para formulaciones de DEN4.

Figura 10: Efecto de la concentración de NaCl en la estabilidad de DENV4 para formulaciones de DEN4.

Figura 11: Efecto de propilenglicol y glicerol en los rendimientos de liofilización de serotipos de dengue.

Figura 12: Efecto de propilenglicol y glicerol en la estabilidad de serotipos de dengue.

Figura 13: Efecto de la concentración de L-15 en la potencia relativa para formulaciones de DEN1 congeladas, secadas por microondas (MVD) y liofilizadas (lio).

Figura 14: Efecto de la concentración de L-15 en la potencia relativa para formulaciones de DEN2 congeladas, secadas por microondas (MVD) y liofilizadas (lio).
Figura 15: Efecto de la concentración de L-15 en la potencia relativa para formulaciones de DEN3 congeladas, secadas por microondas (MVD) y liofilizadas (lio).
Figura 16: Efecto de la concentración de L-15 en la potencia relativa para formulaciones de DEN4 congeladas, secadas por microondas (MVD) y liofilizadas (lio).
Figura 17: Actividad relativa para formulaciones de DEN1 congeladas, secadas por microondas (MVD) y liofilizadas (lio).
Figura 18A-B: A) Estabilidad de formulaciones tetravalentes a 37 °C después de una semana. B) Estabilidad de formulaciones tetravalentes a 25 °C después de un mes.
Figura 19A-D: Estabilidad de formulaciones tetravalentes (DEN1-DEN4) a 2-8 °C evaluadas cada 3 meses hasta 18 meses.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Como se usan en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares “un”, “una” y “el/la” incluyen la referencia al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La referencia a “o” indica cualquier posibilidad o ambas, a menos que el contexto indique claramente una de las posibilidades indicadas. En algunos casos, “y/o” se utilizó para enfatizar cualquiera o ambas posibilidades.

La expresión "alrededor de", cuando modifica la cantidad (por ejemplo, mM o M) de una sustancia o composición, el porcentaje (v/v o p/v) de un componente de una formulación, el pH de una solución/formulación, o el valor de un parámetro que caracteriza un paso en un método, o similares, se refiere a la variación en la cantidad numérica que puede surgir, por ejemplo, en los procesos típicos de medición, manipulación y muestreo durante la preparación, caracterización y/o uso de la sustancia o composición; en los errores instrumentales en dichos procedimientos; en las diferencias en la fabricación, fuente o pureza de los ingredientes empleados para elaborar o usar las composiciones o llevar a cabo los procedimientos; y similares. En algunas formas de realización, “alrededor de” puede referirse a una variación de ± 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 % o 10 %.

La expresión "agentes volumétricos" comprende agentes que proporcionan la estructura del producto liofilizado. Los ejemplos comunes usados para agentes volumétricos incluyen manitol, glicina y lactosa. Además de proporcionar una torta de aspecto elegante desde el punto de vista farmacéutico, los agentes volumétricos también pueden impartir características útiles con respecto a la modificación de la temperatura de colapso, proporcionando protección de

congelamiento-descongelamiento, y mejorando la estabilidad de proteínas durante el almacenamiento a largo plazo. Estos agentes también pueden servir como modificadores de la tonicidad.

La “muestra de referencia de virus del dengue” tiene los mismos componentes y relaciones de formulación de virus del dengue que la muestra de prueba de formulación de virus del dengue, y se refiere a la composición sólida que se produce inmediatamente después de secar la formulación de virus del dengue en las mismas condiciones que la muestra de prueba formulación de virus del dengue (es decir liofilización, secado por microondas, secado por lioesfera), o la composición sólida seca anterior almacenada en condiciones en donde no existe o existe una mínima pérdida de infectividad del virus del dengue (es decir, almacenada a o por debajo de -70 °C.); o la formulación sólida congelada del virus del dengue a -70 °C.

El término “glicol” se refiere a un compuesto químico con dos grupos hidroxilo.

“Pérdida de infectividad” se refiere a la comparación de la pérdida de replicación viral de una muestra de prueba de virus del dengue con una muestra de referencia de virus del dengue usando métodos conocidos en el estado de la técnica. En una forma de realización, la pérdida de infectividad se mide usando un ensayo de infectividad relativa de dengue. En otra forma de realización, la pérdida de infectividad se mide usando un ensayo de placas.

Las expresiones "liofilización", "liofilizado" y “secado por congelación” se refieren a un proceso mediante el cual se congela en primer lugar el material que se debe secar y luego se retira el hielo o solvente congelado mediante sublimación al vacío. Se puede incluir un excipiente en formulaciones previamente liofilizadas para mejorar la estabilidad del producto liofilizado tras el almacenamiento.

“Lioesfera”, como se usa en la presente, se refiere a cuerpos unitarios congelados en seco que comprenden un agente activo desde el punto de vista terapéutico, los cuales tienen forma sustancialmente esférica u ovoidal. En algunas formas de realización, el diámetro de lioesfera es de alrededor de 2 a alrededor de 12 mm, preferentemente de 2 a 8 mm, tal como de 2,5 a 6 mm o 2,5 a 5 mm. En algunas formas de realización, el volumen de la lioesfera es de alrededor de 20 a 550 µl, preferentemente, de 20 a 100 µl, tal como de 20 a 50 µl. En formas de realización en donde la lioesfera no es sustancialmente esférica, el tamaño de la lioesfera se puede describir de acuerdo a su relación de aspecto, que es la relación de la dimensión más larga con respecto a la dimensión más corta. La relación de aspecto de las lioesferas puede ser de 0,5 a 2,5, preferentemente, de 0,75 a 2, tal como de 1 a 1,5.

“Secado al vacío por microondas”, como se usa en la presente, se refiere al método de secado que utiliza radiación de microondas (también conocida como energía de radiación o radiación no ionizante) para la formación de productos vacunales secos (preferentemente, < 6 % de humedad) de una formulación vacunal a través de sublimación. En determinadas formas de realización, el secado por microondas se lleva a cabo como se describe en US2016/0228532. En una forma de realización, la radiación de microondas es en forma de ondas progresivas.

Una "solución reconstituida" es una solución que se preparó al disolver un virus seco en forma sólida (tal como una torta liofilizada) en un diluyente, de modo que el virus está disperso en la solución reconstituida. La formulación reconstituida es adecuada para la administración (por ejemplo, administración intramuscular) y, de manera opcional, puede ser adecuada para la administración subcutánea.

“Sales”, como se usa en la presente, indica sales ácidas formadas con ácidos inorgánicos y/u orgánicos, así como sales básicas formadas con bases inorgánicas y/u orgánicas. Se prefieren las sales aceptables desde el punto de vista farmacéutico (es decir, no tóxicas, aceptables desde el punto de vista fisiológico), aunque otras sales también son útiles. Las sales básicas de ejemplo incluyen sales de amonio, sales de metales alcalinos, tales como sales de sodio, litio y potasio, sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de calcio y magnesio, sales de zinc, sales con bases orgánicas (por ejemplo, aminas orgánicas), tales como N-Me-D-glucamina, colina, trometamina, diciclohexilaminas, t-butil aminas y sales con aminoácidos, tales como arginina, lisina y similares.

“Alcohol de azúcar” se refiere a polioles derivados de un azúcar y que tienen la fórmula general $HOCH_2(CHOH)_nCH_2OH$, n=1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10. Los ejemplos incluyen, entre otros, manitol, sorbitol, eritritol, xilitol y glicerol.

Como se usa en la presente, “x % (p/v)” es equivalente a x g/100 ml (por ejemplo, 5 % p/v es igual a 50 mg/ml).

La expresión “virus vivo atenuado del dengue”, también denominado “LAV” en la presente, se refiere a que la capacidad del virus del dengue de producir la enfermedad está reducida en comparación con el virus del dengue de tipo silvestre. Una persona del oficio de nivel medio comprenderá que los virus pueden experimentar una mutación cuando se cultivan, transfieren o propagan. El LAV puede contener estas mutaciones naturales, además de las mutaciones introducidas con fines de clonación. El LAV puede ser una población homogénea o heterogénea con ninguna, o una o más de estas mutaciones.

La expresión “virus quimérico vivo atenuado” (de manera alternativa, “flavivirus quimérico vivo atenuado”) o “LACV” se refiere a un virus quimérico vivo atenuado en donde el genoma viral comprende una estructura principal de un primer flavivirus (que incluye los genes de C, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B y NS5) y los genes de la preMembrana (prM) y envoltura (E) de un segundo flavivirus, en donde el segundo flavivirus se selecciona de DENV1, DENV2, DENV3 o DENV4. El primer flavivirus puede ser un serotipo de dengue distinto u otro flavivirus, tal como el virus de la fiebre amarilla.

La expresión “Δ30 LAV” se refiere a un virus DEN1, DEN2, DEN3 o DEN4 vivo atenuado, en donde el LAV comprende un genoma viral que contiene una eliminación de alrededor de 30 nucleótidos (nt) que corresponde a una estructura tallo-bucle TL2 de la región no traducida (UTR) 3’ desde alrededor del nt 143 hasta alrededor del nt, lo cual reduce la capacidad replicativa del virus (ver WO 03/092592 y Whitehead *et al*., patente estadounidense N.º 8.337.860).

La expresión “Δ30 LACV” se refiere a un flavivirus quimérico vivo atenuado (LACV) de DENV 1-4, en donde el LACV comprende un genoma viral que contiene una eliminación de alrededor de 30 nt que corresponde a una estructura tallo-bucle TL2 de la región UTR 3’ desde alrededor del nt 143 hasta alrededor del nt 172, lo cual reduce la capacidad replicativa del virus (ver WO 03/092592 y Whitehead *et al*., patente estadounidense N.º 8.337.860).

La expresión“Δ30/Δ31 LAV” se refiere a un virus DEN1, DEN2, DEN3 o DEN4 vivo atenuado, en donde el genoma viral comprende una eliminación de alrededor de 30 nt de la estructura tallo-bucle TL2 de la UTR 3’, y también comprende una eliminación corriente arriba separada no contigua de alrededor de 31 nt en alrededor de nt 258-228 de la UTR 3’, por medio de la cual se elimina la secuencia hasta la estructura homóloga TL-3 inclusive, de modo tal que la eliminación se extiende hasta el límite 5’ de la estructura homóloga TL-3 de la UTR 3’ de dengue. Ver Whitehead *et al*., patente estadounidense N.º 8.337.860. En formas de realización preferidas de la invención, el LAV DEN3 comprende las mutaciones Δ30/Δ31.

La expresión “Δ30/Δ31 LACV” se refiere a un virus DEN1, DEN2, DEN3, o DEN4 quimérico vivo atenuado, como se describió anteriormente, en donde el genoma viral del virus quimérico comprende una eliminación de 30 nt de la estructura tallo-bucle TL2 de la UTR 3’, y también comprende una eliminación de 31 nt corriente arriba separada no contigua de la UTR 3’, que elimina la estructura TL-3, como se describió anteriormente.

El término “LATV” o “vacuna contra el dengue tetravalente viva atenuada” o “vacuna LATV” se refiere a una vacuna que comprende una cantidad eficaz de un LAV o LACV DEN1 o, un LAV o LACV DEN2, un LAV o LACV DEN3 y un LAV o LACV DEN4. En una forma de realización, al menos uno de los LAV o LACV del dengue comprende la mutación Δ30 de la estructura TL-2 en la UTR 3’, como se describió anteriormente y en WO 03/092592. En algunas formas de realización preferidas, la LATV comprende las siguientes características: (1)

rDEN1Δ30, que es un LAV DENV1 en donde el genoma viral de DENV1 comprende una eliminación de 30 nt que corresponde a la estructura tallo-bucle TL2 en la UTR 3'; (2) rDEN2/4Δ30, que es un LACV DENV2 que comprende los genes de prM y E de DENV2 en una estructura principal de DENV4, en donde la estructura principal de DEN4 comprende una eliminación de 30 nt que corresponde a la estructura tallo-bucle TL2 en la UTR 3'; (3) rDEN3Δ30/Δ31, que es un LAV DENV3 en donde el genoma viral de DENV3 comprende una eliminación de 30 nt que corresponde a la estructura tallo-bucle TL2 en la UTR 3' y una eliminación de 31 nt corriente arriba separada no contigua que corresponde a la estructura TL-3 de la UTR 3'; y (4) rDEN4Δ30, que es un LAV DENV4 en donde el genoma viral de DENV4 comprende una eliminación de 30 nt que corresponde a la estructura tallo-bucle TL2 en la UTR 3' (ver Figura 1 de WO2016106107).

"Vacuna no replicativa" se refiere a una vacuna contra el virus del dengue para la prevención o tratamiento de una infección por virus del dengue o los síntomas clínicos de esta, seleccionada de una vacuna de subunidades recombinante, una vacuna inactivada, una vacuna conjugada, o una vacuna de ADN.

"Vacuna inactivada" se refiere a una vacuna que comprende una cantidad eficaz de un virus del dengue completo inactivo o muerto y un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde el virus está inactivado por cualquier medio, incluso con químicos, calor o radiación. Una vacuna inactivada tiene una baja infectividad residual luego de la inactivación, por ejemplo, <5 unidades formadoras de placa (PFU)/ml después de la inactivación. En formas de realización preferidas, hay una muy baja cantidad de infectividad residual luego de la inactivación, por ejemplo, ≤4 PFU/ml, ≤3 PFU/ml, o ≤2 PFU/ml, <1 PFU/ml, ≤0,5 PFU/ml, o ≤0,1 PFU/ml. Las PFU de una vacuna particular se pueden determinar, por ejemplo, al usar un ensayo de placas, un ensayo de inmunotinción, u otro método conocido en el estado de la técnica para detectar la infectividad viral.

"Vacuna conjugada" se refiere a una vacuna que comprende un antígeno de dengue unido de manera covalente a una proteína portadora.

Una "vacuna de ADN" es una vacuna que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno de proteína de dengue, que incluye proteínas de dengue, fragmentos de proteína de dengue, y proteínas de fusión de dengue, y variantes de estas. Las vacunas de ADN comprenden un plásmido (por ejemplo, un plásmido de ADN o viral) que comprende una secuencia de nucleótidos que codifica un antígeno de interés, ligado de manera operativa a un promotor.

"Vacuna de subunidades" se refiere a una vacuna que incluye uno o más componentes antígenos de dengue, no así un virus de dengue completo, tal como epítopos inmunógenos de dengue, proteínas de dengue, proteínas de fusión de antígeno de dengue, que incluyen fusiones de diferentes antígenos de serotipo de dengue, o fragmentos de proteínas de dengue. Las vacunas de subunidades, como se usa en la presente, pueden ser monovalentes

(comprenden un antígeno de dengue único) o multivalentes (comprenden más de un componente antígeno). En formas de realización preferidas, la vacuna de subunidades es tetravalente.

La expresión “sensibilización-refuerzo” se refiere a un régimen terapéutico que comprende (1) administrar a un paciente que lo necesita una primera composición de vacuna contra el virus del dengue, en donde la composición comprende (a) al menos un virus vivo atenuado (LAV) del dengue o flavivirus quimérico vivo atenuado (LACV), y (b) un portador aceptable desde el punto de vista farmacéutico; (2) esperar a que transcurra una cantidad de tiempo predeterminada; y (3) administrar al paciente una segunda composición de vacuna contra el virus del dengue o vacuna contra el dengue no replicativa. La segunda composición de vacuna contra el virus del dengue puede ser igual o distinta a la primera composición de vacuna contra el virus del dengue. En una forma de realización, la segunda vacuna contra el virus del dengue es una vacuna contra el dengue viva atenuada o una vacuna de subunidades recombinante contra el dengue. Las vacunas contra el virus del dengue usadas en las composiciones de la invención son útiles para inducir una respuesta de anticuerpo neutralizante del virus a los virus homólogos de dengue en pacientes humanos.

El término "tratamiento" se refiere a tratamiento terapéutico y medidas profilácticas o preventivas. Los individuos o pacientes “que necesitan” tratamiento incluyen aquellos que ya contrajeron una infección por dengue, ya sea que manifiesten o no algún síntoma clínico, y aquellos con riesgo de infectarse con dengue. El tratamiento de un paciente con las composiciones de vacuna contra el dengue de la invención incluye uno o más de los siguientes: inducir/aumentar una respuesta inmunitaria contra el dengue en el paciente, inducir una respuesta de anticuerpo neutralizante del virus contra uno o más virus del dengue, prevenir, mejorar, eliminar o reducir la probabilidad de manifestaciones clínicas de dengue en pacientes que estuvieron infectados con dengue, prevenir o reducir la probabilidad de desarrollar fiebre por dengue, DHF o DSS y/u otra enfermedad o complicación asociada a una infección por dengue, reducir la gravedad o duración de los síntomas clínicos de una infección por dengue y/u otra enfermedad o complicación asociada al dengue, y prevenir o reducir la probabilidad de infección por dengue.

La expresión “cantidad eficaz desde el punto de vista farmacéutico" o “cantidad eficaz” se refiere a que se administra una composición vacunal suficiente a un paciente para producir un efecto deseado, que incluye, entre otros: inducir/aumentar una respuesta inmunitaria contra el dengue en el paciente, inducir/aumentar una respuesta de anticuerpo neutralizante del virus contra el dengue en un paciente, prevenir o reducir la probabilidad de infección por dengue, prevenir o reducir la probabilidad de infección por dengue recurrente, prevenir, mejorar o eliminar las manifestaciones clínicas de infección por dengue en pacientes que estuvieron infectados con dengue, prevenir la fiebre por dengue, DHF y/o DSS, o reducir la gravedad o duración de una enfermedad asociada a dengue. Una persona del oficio de nivel medio reconoce que este nivel puede variar.

La expresión “respuesta inmunitaria” se refiere a una respuesta inmunitaria mediada por células (linfocitos T) y/o una respuesta de anticuerpo (linfocitos B).

El término “paciente” se refiere a un mamífero que se puede infectar con un virus del dengue, tal como DEN1, DEN2, DEN3 o DEN4, para recibir las composiciones de vacuna contra el dengue descritas en la presente, que incluye individuos inmunocompetentes e inmunocomprometidos. En formas de realización preferidas, el paciente es un ser humano. Como se define en la presente, un "paciente" incluye a aquellos que ya están infectados con dengue, ya sea mediante infección natural o vacunación, o aquellos que puedan estar expuestos posteriormente.

Un “adyuvante tipo ISCOM" es un adyuvante que comprende un complejo inmunoestimulante (ISCOM), el cual comprende una saponina, colesterol, y un fosfolípido, que juntos forman una partícula tipo jaula característica, que tiene una estructura tipo jaula esférica única que contribuye a su función (para reseña, ver Barr y Mitchell, *Immunology and Cell Biology* 74: 8-25 (1996)). Este término incluye los adyuvantes ISCOM™, que se producen con un antígeno y que comprenden antígeno dentro de la partícula ISCOM™ y adyuvantes de matriz ISCOM™, los cuales son adyuvantes tipo ISCOM huecos que se producen sin antígeno. En formas de realización preferidas de las composiciones y métodos proporcionados en la presente, el adyuvante tipo ISCOM es un adyuvante de partículas de matriz ISCOM™, tal como ISCOMATRIX™, que se elabora sin antígeno (ISCOM™ e ISCOMATRIX™ son marcas registradas de CSL Limited, Parkville, Australia).

La designación “rDEN1Δ30-1545” se refiere a un virus 1 de dengue recombinante en donde el genoma viral comprende (1) una eliminación de 30 nt de la estructura tallo-bucle TL2 de la UTR 3’ y (2) una sustitución en la posición nucleotídica 1545 para G, que ocurrió después de la adaptación del virus al crecimiento en células Vero.

La designación “rDEN2/4 Δ 30(ME)-1495,7163” se refiere a un virus 2/4 de dengue quimérico recombinante, en donde el genoma viral comprende: (1) una estructura principal 4 de dengue (genes de C, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) que comprende (i) una eliminación de 30 nt de la estructura tallo-bucle TL2 de la UTR 3’, y (ii) sustituciones en la posición nucleotídica 1495 para U y 7163 para C, que ocurrieron después de la adaptación del virus al crecimiento en células Vero, y (2) genes de pr<u>M</u> y <u>E</u> 2 de dengue.

La designación “rDEN3Δ30/31-7164” se refiere a un virus 3 de dengue recombinante, en donde el genoma viral comprende: (1) una eliminación de 30 nt de la estructura tallo-bucle TL2 de la UTR 3’, (2) una eliminación de 31 nt separada en la UTR 3’ corriente arriba de la mutación Δ30, que elimina la estructura TL-3, y (3) una sustitución en la posición nucleotídica 7164 para C, que ocurrió después de la adaptación del virus al crecimiento en células Vero.

La designación “rDEN4Δ 30-7132,7163,8308” se refiere a un virus 4 de dengue recombinante, en donde el genoma viral comprende: (1) una eliminación de 30 nt de la estructura

tallo-bucle TL2 de la UTR 3' y (2) sustituciones en la posición nucleotídica 7132 para U, 7163 para C y 8308 para G, que ocurrieron después de la adaptación del virus al crecimiento en células Vero.

"V180" se refiere a una vacuna de subunidades tetravalente que comprende glucoproteínas de envoltura truncadas (DEN-80E) de cada uno de los 4 serotipos de virus del dengue (DENV1, DENV2, DENV3, y DENV4), en donde cada una de las proteínas de E constituyen aproximadamente el 80 % de la longitud de E de tipo silvestre comenzando con el residuo de aminoácido 1 en su terminal N, de modo que dicha proteína de E se puede secretar en un medio de crecimiento cuando se expresa de manera recombinante en una célula huésped. Ver Coller *et al*. WO 2012/154202.

En la presente se usan las siguientes abreviaturas y estas tienen los siguientes significados: C es el gen de cápside de dengue, DEN (de manera alternativa, DENV) es el virus del dengue, DF es fiebre por dengue, DHF es fiebre hemorrágica por dengue, DSS es síndrome de choque por dengue, h es horas, GMT es título de la media geométrica, IM es intramuscular, IMX es Iscomatrix™, JE es encefalitis japonesa, LAV es virus vivo atenuado, NS (usado en NS1-NS5) es no estructural, nt es nucleótido, PFU es unidades formadoras de placa, prM es gen de preMembrana de dengue, SC es subcutáneo, TBE es encefalitis transmitida por garrapatas, UTR es región no traducida, WN (de manera alternativa, WNV) es virus del Nilo Occidental, YF (de manera alternativa, YFV) es virus de la fiebre amarilla, y wt es tipo silvestre.

Vacuna contra el virus del dengue viva atenuada

Como se indicó anteriormente, las composiciones de vacuna contra el virus del dengue de la invención comprenden una vacuna contra el dengue viva atenuada que comprende al menos un LAV, seleccionado del grupo que consiste en un virus del dengue tipo 1 (DEN1), un virus del dengue tipo 2 (DEN2), un virus del dengue tipo 3 (DEN3) y un virus del dengue tipo 4 (DEN4), o LACV. En una forma de realización, el LAV o LACV comprende un genoma viral que comprende una modificación Δ30 de TL-2 en la UTR 3', y en donde el LAV o el LACV: induce una respuesta inmunitaria contra el dengue, induce una respuesta de anticuerpo neutralizante del virus contra el dengue, protege contra o reduce la probabilidad de infección o reduce la gravedad o duración de las manifestaciones clínicas de esta. En formas de realización de la invención, la vacuna contra el dengue viva atenuada es monovalente, bivalente, trivalente o tetravalente, es decir, induce una respuesta inmunitaria contra o protege contra uno, dos, tres o cuatro de los serotipos de DEN 1-4, respectivamente. En formas de realización preferidas de la invención, la vacuna contra el dengue viva atenuada es tetravalente, es decir, induce una respuesta inmunitaria contra o protege contra los serotipos de DEN 1-4 y comprende un componente de DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4, en donde cada componente es un LAV o un LACV.

En formas de realización adicionales de la invención, la vacuna contra el dengue

viva atenuada es un LAV tetravalente o "LATV" (es decir, comprende virus vivos atenuados del dengue de DENV 1-4, o flavivirus quiméricos vivos atenuados de DENV 1-4, como se define en la presente, o una combinación de estos, en donde al menos uno de los LAV o de los LACV es un Δ30LAV o un Δ30LACV). En formas de realización adicionales de la invención, la vacuna contra el dengue viva atenuada es tetravalente y comprende al menos un flavivirus quimérico; en donde el flavivirus quimérico comprende un genoma viral que contiene secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de prM y E de un serotipo único de virus del dengue y secuencias de nucleótidos que codifican la cápside y las proteínas no estructurales de un flavivirus distinto, en donde el flavivirus quimérico está atenuado. En algunas formas de realización de la invención, la cápside y proteínas no estructurales del flavivirus quimérico son de un serotipo de dengue distinto al de las proteínas de prM y E.

En algunas formas de realización de la invención, cada componente de LAV o LACV de una LATV de la invención comprende un virus vivo atenuado, que es, independientemente, un flavivirus quimérico atenuado o un virus del dengue atenuado que comprende la modificación Δ30 de TL-2 en la UTR 3' del genoma viral. La atenuación del virus del dengue se logra a través de la modificación Δ30 de TL-2. Sin embargo, las mutaciones atenuantes adicionales también se pueden incluir en uno o más componentes de la vacuna, que incluyen, entre otros: mutaciones en las posiciones 1495, 1545, 7132, 7163, 7164 y 8308. Las mutaciones atenuantes se pueden lograr mediante diferentes técnicas, que incluyen métodos conocidos en el estado de la técnica, tal como a través de pasajes en serie en cultivo tisular o a través de manipulaciones genéticas más definidas. Las mutaciones útiles para atenuar los virus del dengue y los virus quiméricos del dengue son conocidas en el estado de la técnica. Ver, por ejemplo, WO 02/095075, WO 2006/44857, patente estadounidense N.º 7.189.403, patente estadounidense N.º 8.337.860, WO 2003/103571, WO 2000/014245, y WO 2008/022196. Las cepas de dengue atenuadas conocidas también se pueden usar en las composiciones en la presente, tal como las cepas descritas en WO 06/134433, WO 2006/134443, WO 2007/141259, WO 96/40933, WO 2000/057907, WO 2000/057908, WO 2000/057909, WO 2000/057910, y WO 2007/015783.

Las formas de realización preferidas de las composiciones de la invención comprenden una vacuna viva atenuada tetravalente (LATV) contra el dengue. Dicha vacuna viva atenuada tetravalente puede comprender cuatro virus del dengue atenuados (LAV), tres LAV y una cepa de flavivirus quimérico atenuado (LACV), dos LAV del dengue y dos LACV, un LAV del dengue y tres LACV, o cuatro LACV.

En formas de realización preferidas, la LATV comprende las siguientes características: (1) rDEN1Δ30, que es un LAV DENV1 en donde el genoma viral de DENV1 comprende una eliminación de 30 nt que corresponde a la estructura tallo-bucle TL2 en la UTR 3'; (2) rDEN2/4Δ30, que es un LACV DENV2 que comprende los genes de prM y E de DENV2 en una estructura principal de DENV4, en donde la estructura principal de DEN4 comprende una

eliminación de 30 nt que corresponde a la estructura tallo-bucle TL2 en la UTR 3'; (3) rDEN3 Δ30/Δ31, que es un LAV DENV3 en donde el genoma viral de DENV3 comprende una eliminación de 30 nt que corresponde a la estructura tallo-bucle TL2 en la UTR 3' y una eliminación de 31 nt corriente arriba separada no contigua que corresponde a la estructura TL-3 de la UTR 3'; y (4) rDEN4Δ30, que es un LAV DENV4 en donde el genoma viral de DENV4 comprende una eliminación de 30 nt que corresponde a la estructura tallo-bucle TL2 en la UTR 3'.

En formas de realización de la invención que comprenden flavivirus quiméricos, en donde cada flavivirus quimérico comprende un genoma viral que comprende secuencias de nucleótidos que codifican las proteínas de prM y E de un serotipo único de virus del dengue y secuencias de nucleótidos que codifican la cápside y las proteínas no estructurales (es decir, "la estructura principal") de un flavivirus distinto, en donde cada flavivirus quimérico está atenuado. Los métodos para la construcción de una cepa de flavivirus vivo atenuado recombinante pueden comprender el uso de una cepa atenuada conocida como base, en donde el método comprende sustituir los genes adecuados (prM y E) de un virus de interés relacionado por los genes equivalentes del virus de base. Por ejemplo, este enfoque se usó para el WNV en donde el virus quimérico es quimérico intertípico en función de una cepa de DEN-4 atenuada que comprende los genes de prM y E de WNV (Bray, M. *et al.*, *J. Virol.* (1996) 70:4162-4166; Chen, W., *et al., J. Virol.* (1995) 69:5186-5190; Bray, M. y Lai, C.-J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1991) 88:10342-10346; Lai, C. J. *et al.*, *Clin. Diagn. Virol.* (1998) 10:173-179).

Otro enfoque fue el uso de la cepa de fiebre amarilla atenuada YF 17D como base para desarrollar vacunas quiméricas recombinantes, la cual se usó previamente para el virus de JE, los virus de DEN y el virus de WN. Se puede elaborar una vacuna contra la fiebre amarilla quimérica que comprende una estructura principal de fiebre amarilla al reemplazar los genes que codifican las proteínas de prM y E de cualquier cepa de fiebre amarilla, por ejemplo, YFV 17D, por los de un serotipo de dengue. Después de la clonación de ADN, el ARN se transcribe y se transfecta a las células Vero para obtener virus quiméricos que tengan el mecanismo de replicación de YFV 17D y el recubrimiento externo del virus de dengue relevante. Ver Guirakhoo *et al.*, *Journal of Virology*, 74(12): 5477–5485 (2000); Guy *et al.*, *Vaccine* 28: 632–649 (2010); Monath T.P. *Adv Virus Res* (2003) 61:469-509; Monath *et al . Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2006) 103:6694; y WO 98/37911. Por lo tanto, en algunas formas de realización de la invención, la vacuna contra el dengue viva atenuada comprende (1) al menos un flavivirus quimérico que comprende las proteínas de prM y E de un serotipo de dengue único y una estructura principal de fiebre amarilla y (2) al menos un LAV o LACV que comprende un genoma viral que comprende una eliminación de 30 nucleótidos de la estructura tallo-bucle TL-2 de la UTR 3'.

Los flavivirus vivos atenuados quiméricos útiles en las composiciones de la invención también pueden comprender un virus del dengue quimérico, en donde el genoma viral

comprende los genes de prM y E de un serotipo de virus del dengue único y la cápside y los genes no estructurales de un serotipo de virus del dengue diferente. En formas de realización en donde el virus quimérico comprende una estructura principal de un segundo serotipo de dengue, la estructura principal de dengue comprende una eliminación de alrededor de 30 nucleótidos de la UTR 3' que corresponde a la estructura tallo-bucle TL-2 y, opcionalmente, puede comprender mutaciones atenuantes adicionales. Cualquier virus de dengue atenuado o virus de dengue de tipo silvestre se puede usar como la estructura principal del virus quimérico, al introducir una eliminación de 30 nucleótidos de la estructura tallo-bucle TL-2 en una estructura principal de dengue atenuado o estructura principal viral de dengue de tipo silvestre. La atenuación de una estructura principal de virus del dengue se puede lograr a través de pasajes en serie, a través de la introducción de mutaciones genéticas definidas, o a través del uso de cepas de dengue atenuadas conocidas. Las vacunas contra el dengue quiméricas se describen, por ejemplo, en Whitehead *et al.* WO 03/092592. En algunas formas de realización de la invención, la vacuna viva atenuada comprende un flavivirus quimérico en donde la cápside y las proteínas no estructurales son de un serotipo de dengue distinto al de las proteínas de prM y E.

Las composiciones de vacuna contra el virus del dengue de la invención comprenden una cantidad eficaz de vacuna elaborada con virus vivo atenuado. En algunas formas de realización de la invención, la potencia de la vacuna contra el dengue viva atenuada es de 10 a alrededor de $1x10^7$ de unidades formadoras de placa (PFU). En formas de realización alternativas, la potencia de la vacuna contra el dengue viva atenuada es de alrededor de $1x10^2$ a alrededor de $1x10^6$ PFU. En otras formas de realización, la potencia de la vacuna contra el dengue viva atenuada es de alrededor de $1x10^3$ a alrededor de $1x10^5$ PFU.

Los ensayos de placas virales determinan la cantidad de unidades formadoras de placa (pfu) en una muestra de virus. En síntesis, en un ensayo de inmunoplaca de dengue, se infecta una monocapa confluente de células huésped (por ejemplo, células Vero) con virus de dengue a diversas diluciones y se recubre con un medio de superposición semisólido, que contiene metilcelulosa, para evitar que la infección viral se propague de manera indiscriminada. Las células infectadas con virus se lisarán y propagarán la infección a células adyacentes, en donde se repite el ciclo de "infección a lisis". Las células infectadas formarán una placa (un grupo de células Vero infectadas rodeadas de células no infectadas) que se puede observar de manera visual después de la fijación y la inmunotinción usando anticuerpos monoclonales (mAb) anti-dengue específicos para un serotipo. Las placas se cuentan y los resultados, en combinación con los factores de dilución, se usan para calcular la cantidad de unidades formadoras de placa por ml (pfu/ml) en las muestras. El resultado de potencia contra el dengue en pfu/ml representa la cantidad de partículas infecciosas en la muestra y se basa en la suposición de que cada placa que se forma representa una partícula viral infecciosa.

Vacuna de subunidades contra el dengue

En algunas formas de realización de la invención, las formulaciones también comprenden una vacuna de subunidades recombinante contra el dengue que comprende una o más proteínas de antígeno de dengue. En formas de realización preferidas de este aspecto de la invención, la vacuna de subunidades recombinante contra el dengue comprende una o más proteínas de dengue, proteínas de fusión, o un fragmento o fragmentos de estas. En otras formas de realización preferidas, la vacuna de subunidades recombinante contra el dengue comprende envoltura o proteína de E de dengue, o un fragmento de estas.

En otras formas de realización preferidas, la vacuna de subunidades recombinante contra el dengue es tetravalente, es decir, se dirige a una respuesta inmunitaria contra los cuatro serotipos de dengue. Una vacuna de subunidades recombinante contra el dengue puede comprender cuatro proteínas de dengue recombinantes o menos de cuatro, por ejemplo, una proteína de DEN1 recombinante, una proteína de DEN2 recombinante, y una proteína de fusión de DEN3/4 recombinante. En algunas formas de realización, la vacuna de subunidades recombinante contra el dengue comprende una glucoproteína de envoltura de virus del dengue, o fragmentos de esta, de DEN1-4 (por ejemplo, DEN1-80E, DEN2-80E, DEN3-80E, DEN4-80E, o DEN4-80EZip) que es producida y secretada mediante un sistema de expresión recombinante. Dicha vacuna de subunidades puede comprender, opcionalmente, un adyuvante, como se describe con mayor detalle más adelante.

En algunas formas de realización de este aspecto de la invención, la vacuna de subunidades recombinante contra el dengue comprende una o más proteínas de envoltura ("E") de virus del dengue purificadas, un excipiente aceptable desde el punto de vista farmacéutico, en donde cada una de las proteínas de E constituye aproximadamente el 80 % de la longitud de E de tipo silvestre comenzando con el residuo de aminoácido 1 en su terminal N, de modo que dicha proteína de E se puede secretar en el medio de crecimiento cuando se expresa de manera recombinante en una célula huésped y en donde la composición induce la producción de anticuerpos neutralizantes en sujetos humanos. En algunas formas de realización de la invención, la vacuna de subunidades recombinante contra el dengue también comprende una cantidad eficaz de un adyuvante. En algunas formas de realización de la invención, la proteína de E de DEN-4 es dimérica ("DEN4-80EZip"), como se describe en US 6.749.857 y WO 2012/154202.

En algunas formas de realización de este aspecto de la invención, las proteínas de E en la composición descrita anteriormente se producen de manera recombinante y se expresan en células huésped de insecto. En otras formas de realización preferidas, la proteína de E se produce de manera recombinante y se expresa en células huésped Schneider 2 (S2) de *Drosophila melanogaster*.

Las proteínas de E de virus del dengue recombinantes se pueden producir por medio de un sistema de expresión de cultivo celular que usa células Schneider 2 (S2) de *Drosophila*. Se demostró que este sistema produce proteínas de envoltura de dengue

recombinantes que mantienen la estructura nativa (Cuzzubbo *et al., Clin. Diagn. Lab. Immunol.* (2001) 8:1150-55; Modis *et al., Proc. Natl. Acad. Sci.* (2003) 100:6986-91; Modis *et al., Nature* (2004) 427:313-9; Zhang *et al.,* Structure (2004)12(9):1607-18). También se mostró que este sistema de expresión expresa otras proteínas de envoltura recombinantes de otros flavivirus, tal como los virus de Nilo Occidental, encefalitis japonesa, hepatitis C, y encefalitis transmitida por garrapatas. Las proteínas de envoltura de dengue recombinantes se pueden truncar en el terminal C, lo que deja 80 % de la proteína de envoltura nativa ("80E"). Por lo tanto, 80E se define como aproximadamente el primer 80 % de aminoácidos consecutivos de proteína de E comenzando con el aminoácido 1 de su terminal N.

Como se mencionó anteriormente, algunas formas de realización de este aspecto de la invención comprenden proteínas de 80E truncadas que consisten aproximadamente en 80 % de la longitud de E de tipo silvestre comenzando con el residuo de aminoácido 1 en su terminal N. Las proteínas de E usadas en algunas formas de realización de la invención eliminan la porción de anclaje de membrana (aproximadamente el último 10 % de E en el extremo carboxi) de la proteína. En otras palabras, las proteínas de 80E truncadas que se usaron en formas de realización específicas de la invención consisten en hasta el primer 90 % de aminoácidos consecutivos de E comenzando en el aminoácido 1 de su terminal N, y así permite que se secreten al medio extracelular, lo cual facilita la recuperación. El truncamiento también puede eliminar la porción "tallo" de la proteína de E que une la porción de 80E con la porción de anclaje de membrana; la porción de tallo no contiene epítopos antigénicos notables y, por lo tanto, no está incluida en los antígenos preferidos, DEN1-80E, DEN2-80E, DEN3-80E, DEN4-80E, o DEN4-80EZip. Más del 90 %, pero menos del 100 %, de la proteína de E se puede clonar y secretar, es decir, la proteína puede ser 90 %+ en longitud, truncada en carboxi, y puede incluir una porción del dominio que abarca la membrana, siempre que se pueda secretar la proteína de E truncada. La expresión "que se puede secretar" significa que tiene posibilidades de secretarse, y que en general se secreta, de las células transformadas en el sistema de expresión. Por lo tanto, una persona del oficio de nivel medio comprenderá que las proteínas de E de dengue que son útiles en las composiciones y métodos de la presente invención pueden variar del 80 % ejemplificado en la presente, siempre que se pueda secretar la proteína. En formas de realización preferidas de cada aspecto de la presente invención, las proteínas de E de DEN son alrededor de 80 % en longitud comenzando con el aminoácido de terminal N de la proteína de envoltura y terminando en un aminoácido en el rango del aminoácido 393 al 401, por ejemplo, del aminoácido 1 al aminoácido 395 del tipo de virus del dengue 2.- En formas de realización alternativas de cada aspecto de la invención, la proteína de E de dengue puede ser alrededor de 75 %, alrededor de 85 %, alrededor de 90 %, alrededor de 95 %, o alrededor de 98 % de los aminoácidos consecutivos de E comenzando en el aminoácido 1 de su terminal N. En formas de realización de ejemplo de aspectos de la presente invención, la proteína de E

de DEN es aproximadamente 80 % de aminoácidos consecutivos de la proteína de E comenzando en el aminoácido 1 de su terminal N; tal como DEN1- 80E, como se indica en SEQ ID NO:1, DEN2- 80E, como se indica en SEQ ID NO:2, DEN3- 80E, como se indica en SEQ ID NO:3 y DEN4- 80E, como se indica en SEQ ID NO:4.

La proteína de E secretada también puede contener dominios que facilitan la dimerización, tal como en la proteína DEN4-80EZip, de modo que también se mejora la inmunogenicidad de la proteína recombinante. Una proteína DEN4-80EZip de ejemplo comprende una secuencia de aminoácidos como se indica en SEQ ID NO:5. En algunas formas de realización de este aspecto de la invención, los antígenos de DEN1, DEN2, y DEN3 80E incluidos en la composición son monoméricos y el antígeno de DEN4 80E es dimérico.

En formas de realización alternativas de este aspecto de la invención, las proteínas DEN1-80E, DEN2-80E, DEN3-80E y DEN4-80E en la composición son monoméricas. En tales formas de realización, el componente de DEN4 está presente en una cantidad que es alrededor de 1,5 a alrededor de 3 veces las cantidades individuales de proteínas de DEN1, DEN2, y DEN3, preferentemente, alrededor de 2 veces la cantidad de los componentes de DEN1, DEN2 y DEN3 (proteínas). En formas de realización preferidas de este aspecto de la invención, la relación de antígenos de DEN1:DEN2:DEN3:DEN4 en las composiciones es aproximadamente 1:1:1:2.

En formas de realización de la invención que comprenden proteínas de E de dengue, la cantidad de cada proteína de E en la composición es de alrededor de 0,5 μg a alrededor de 500 μg. En formas de realización alternativas, la cantidad de cada proteína de E es de alrededor de 0,5 μg a alrededor de 450 μg, 0,5 μg a alrededor de 400 μg, 0,5 μg a alrededor de 350 μg, 0,5 μg a alrededor de 300 μg, 0,5 μg a alrededor de 250 μg, 0,5 μg a alrededor de 200 μg, 0,5 μg a alrededor de 150 μg, 0,5 μg a alrededor de 100 μg, 0,5 μg a alrededor de 50 μg, 5,0 μg a alrededor de 500 μg, 5,0 μg a alrededor de 450 μg, 5,0 μg a alrededor de 400 μg, 5,0 μg a alrededor de 350 μg, 5,0 μg a alrededor de 300 μg, 5,0 μg a alrededor de 250 μg, 5,0 μg a alrededor de 200 μg, 5,0 μg a alrededor de 150 μg, 5,0 μg a alrededor de 100 μg, 5,0 μg a alrededor de 50 μg, 10 μg a alrededor de 500 μg, 10 μg a alrededor de 450 μg, 10 μg a alrededor de 400 μg, 10 μg a alrededor de 350 μg, 10 μg a alrededor de 300 μg, 10 μg a alrededor de 250 μg, 10 μg a alrededor de 200 μg, 10 μg a alrededor de 150 μg, 10 μg a alrededor de 100 μg, 10 μg a alrededor de 50 μg, 25 μg a alrededor de 500 μg, 25 μg a alrededor de 450 μg, 25 μg a alrededor de 400 μg, 25 μg a alrededor de 350 μg, 25 μg a alrededor de 300 μg, 25 μg a alrededor de 250 μg, 25 μg a alrededor de 200 μg, 25 μg a alrededor de 150 μg, 25 μg a alrededor de 100 μg, o 25 μg a alrededor de 50 μg. En otras formas de realización preferidas, la cantidad de cada proteína de E en la composición es de alrededor de 1,0 μg a alrededor de 100 μg. En otras formas de realización, la cantidad de cada proteína de E en la composición se selecciona de aproximadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 o 500 μg.

Vacuna contra el dengue inactivada

Las vacunas contra el dengue inactivadas en la presente comprenden uno o más virus del dengue completos inactivados y/o uno o más virus quiméricos del dengue inactivados. En algunas formas de realización de este aspecto de la invención, la vacuna contra el dengue inactivada es tetravalente y comprende DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4 completos inactivados. En formas de realización alternativas, la vacuna inactivada comprende cuatro virus del dengue quiméricos inactivados. En aun otras formas de realización, la vacuna inactivada es tetravalente y comprende uno o más virus del dengue completos inactivados y uno o más virus del dengue quiméricos inactivados, por ejemplo, un virus de DEN1 completo inactivado, un virus de DEN2 completo inactivado, un virus quimérico de DEN3 inactivado y un virus quimérico de DEN4 inactivado. Una persona del oficio de nivel medio comprenderá que se puede usar cualquier combinación de virus de DEN quiméricos o completos inactivados en los métodos y las composiciones tetravalentes de la invención, siempre que la composición vacunal actúe sobre los cuatro serotipos de dengue.

Las vacunas contra el dengue inactivadas útiles en las composiciones y métodos de la invención se describen en Putnak *et al*. *Vaccine* 23: 4442–4452 (2005), US 6190859, US 6254873 y Sterner *et al*. WO 2007/002470. De manera alternativa, las cepas de virus del dengue y las cepas de dengue quimérico/cepas de flavivirus quimérico se pueden inactivar para usar en las composiciones a través de métodos conocidos en el estado de la técnica, por ejemplo, con químicos, calor o radiación.

En consecuencia, la presente invención también se refiere a las formulaciones anteriores que comprenden cantidades eficaces de una vacuna contra el dengue viva atenuada y una vacuna contra el dengue no replicativa, en donde la vacuna contra el dengue viva atenuada comprende al menos un virus vivo atenuado (LAV) del dengue o al menos un flavivirus quimérico vivo atenuado (LACV), en donde el LAV o LACV comprenden un genoma viral que comprende una eliminación de 30 nucleótidos de la estructura tallo-bucle TL-2 en la UTR 3'. En algunas formas de realización de la invención, la vacuna contra el dengue no replicativa de las composiciones de vacuna contra el virus del dengue de la invención se selecciona de una vacuna de subunidades recombinante contra el dengue o una vacuna contra el dengue inactivada. En una forma de realización, la formulación está liofilizada, congelada, secada por microondas o tiene lioesferas con cantidades eficaces de una vacuna contra el dengue viva atenuada y una vacuna contra el dengue no replicativa. En otra forma de realización, la formulación de vacuna contra el dengue viva atenuada se reconstituye con una solución líquida que comprende la vacuna contra el dengue no replicativa, por ejemplo, V180.

En formas de realización preferidas de la invención, las vacunas contra el dengue vivas atenuadas y no replicativas son tetravalentes (es decir, comprenden componentes de

DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4 o inducen una respuesta inmunitaria contra DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4).

Adyuvantes

Se estudió de manera exhaustiva la coadministración de vacunas con compuestos que pueden mejorar la respuesta inmunitaria contra el antígeno de interés, conocidos como adyuvantes. Además de aumentar la respuesta inmunitaria contra el antígeno de interés, algunos adyuvantes se pueden usar para disminuir la cantidad de antígeno necesario para provocar la respuesta inmunitaria deseada o disminuir la cantidad de inyecciones que se necesitan en un régimen clínico para inducir una respuesta inmunitaria durable y proporcionar protección contra la enfermedad.

Para ese fin, las formulaciones de vacuna contra el virus del dengue de la invención pueden usar un adyuvante. El adyuvante de las formulaciones descritas en la presente puede ser cualquier adyuvante que realice la función deseada, como se describió anteriormente, y que no inactive o tenga un impacto significativo en el título del LAV o LACV de la composición.

Se determinó que los compuestos a base de aluminio tenían actividad de adyuvante hace más de 60 años (para revisión, ver Lindblad, E.B. *Immunol. y Cell Biol*. 82: 497-505 (2004); Baylor *et al. Vaccine* 20: S18-S23 (2002)). En general, se considera que los adyuvantes de aluminio son seguros cuando se usan en dosis adecuadas. Muchos de estos fueron aprobados para administración en seres humanos por entes reguladores en el mundo.

En consecuencia, los compuestos a base de aluminio, tales como hidróxido de aluminio ($Al(OH)_3$), hidroxifosfato de aluminio ($AlPO_4$), sulfato de hidroxifosfato de aluminio amorfo (AAHS), o denominado "alum" ($KAl(SO_4)\cdot 12H_2O$) (ver Klein *et al.,* Analysis of aluminum hydroxyphosphate vaccine adjuvants by Al MAS NMR., *J. Pharm. Sci*. 89(3): 311-21 (2000)), se pueden combinar con las composiciones proporcionadas en la presente. En formas de realización de ejemplo de la invención proporcionadas en la presente, el adyuvante de aluminio es hidroxifosfato de aluminio o AAHS. En formas de realización alternativas, el adyuvante de aluminio es un adyuvante de fosfato de aluminio, denominado en la presente “APA”. En otras formas de realización, el adyuvante es hidróxido de aluminio.

Una persona del oficio de nivel medio podrá determinar una dosis óptima de adyuvante de aluminio que sea segura y eficaz para aumentar la respuesta inmunitaria a los virus del dengue diana. Para una discusión sobre el perfil de seguridad del aluminio, así como las cantidades de aluminio incluidas en vacunas con licencia de la FDA, ver Baylor *et al*., *Vaccine* 20: S18-S23 (2002). Generalmente, una dosis eficaz y segura de adyuvante de aluminio varía de 50 µg a 1,25 mg de aluminio elemental por dosis (100 µg/ml a 2,5 mg/ml de concentración).

Por lo tanto, las formas de realización específicas de la presente invención incluyen composiciones que comprenden una vacuna contra el virus del dengue viva atenuada y

también comprenden un adyuvante de aluminio. En formas de realización de la invención, las composiciones de dengue comprenden un adyuvante que comprende de alrededor de 50 µg a alrededor de 1,25 mg de aluminio elemental por dosis de vacuna. En otras formas de realización, el adyuvante de aluminio por dosis de composición vacunal comprende una cantidad de aluminio elemental que varía de alrededor de 100 µg a alrededor de 1,0 mg, de alrededor de 100 µg a alrededor de 900 µg, de alrededor de 100 µg a alrededor de 850 µg, de alrededor de 100 µg a alrededor de 800 µg, de alrededor de 100 µg a alrededor de 700 µg, de alrededor de 100 µg a alrededor de 600 µg, de alrededor de 100 µg a alrededor de 500 µg, de alrededor de 100 µg a alrededor de 400 µg, de alrededor de 100 µg a alrededor de 300 µg, de alrededor de 100 a alrededor de 250 µg, de alrededor de 200 µg a alrededor de 1,25 mg, de alrededor de 200 µg a alrededor de 1,0 mg, de alrededor de 200 µg a alrededor de 900 µg, de alrededor de 200 µg a alrededor de 850 µg, de alrededor de 200 µg a alrededor de 800 µg, de alrededor de 200 µg a alrededor de 700 µg, de alrededor de 200 µg a alrededor de 600 µg, de alrededor de 200 µg a alrededor de 500 µg, de alrededor de 200 µg a alrededor de 400 µg, de alrededor de 200 µg a alrededor de 300 µg, de alrededor de 300 µg a alrededor de 1,25 mg, de alrededor de 300 µg a alrededor de 1,0 mg, de alrededor de 300 µg a alrededor de 900 µg, de alrededor de 300 µg a alrededor de 850 µg, de alrededor de 300 µg a alrededor de 800 µg, de alrededor de 300 µg a alrededor de 700 µg, de alrededor de 300 µg a alrededor de 600 µg, de alrededor de 300 µg a alrededor de 500 µg, de alrededor de 300 µg a alrededor de 400 µg, de alrededor de 400 µg a alrededor de 1,25 mg, de alrededor de 400 µg a alrededor de 1,0 mg, de alrededor de 400 µg a alrededor de 900 µg, de alrededor de 400 µg a alrededor de 850 µg, de alrededor de 400 µg a alrededor de 800 µg, de alrededor de 400 µg a alrededor de 700 µg, de alrededor de 400 µg a alrededor de 600 µg, de alrededor de 400 µg a alrededor de 500 µg, de alrededor de 500 µg a alrededor de 1,25 mg, de alrededor de 500 µg a alrededor de 1,0 mg, de alrededor de 500 µg a alrededor de 900 µg, de alrededor de 500 µg a alrededor de 850 µg, de alrededor de 500 µg a alrededor de 800 µg, de alrededor de 500 µg a alrededor de 700 µg, de alrededor de 500 µg a alrededor de 600 µg, de alrededor de 600 µg a alrededor de 1,25 mg, de alrededor de 600 µg a alrededor de 1,0 mg, de alrededor de 600 µg a alrededor de 900 µg, de alrededor de 600 µg a alrededor de 850 µg, de alrededor de 600 µg a alrededor de 800 µg, o de alrededor de 600 µg a alrededor de 700 µg.

Otros adyuvantes que se pueden usar junto con las composiciones de vacuna contra el virus del dengue de la invención, incluyen, entre otros, los adyuvantes que contienen oligonucleótidos CpG, u otras moléculas que actúan sobre los receptores tipo Toll, tales como TLR4 y TLR9 (para análisis, ver, Daubenberger, C.A., *Curr. Opin. Mol. Ther.* 9(1):45-52 (2007); Duthie *et al*., *Immunological Reviews* 239(1): 178-196 (2011); Hedayat *et al*., *Medicinal Research Reviews* 32(2): 294-325 (2012)), que incluyen lipopolisacárido, monofosforilípido A, y 4-fosfatos de aminoalquil glucosaminida. Los adyuvantes adicionales útiles en las composiciones de la invención incluyen oligonucleótidos inmunoestimulatorios (IMO; ver, por

ejemplo, U.S. 7.713.535 y U.S. 7.470.674); epítopos de linfocitos T cooperadores, lípido A y derivados o variantes de estos, liposomas, fosfato de calcio, citocinas, (por ejemplo, factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF) IL-2, IFN-α, Flt-3L), CD40, CD28, CD70, IL-12, proteína de choque térmico (HSP) 90, CD134 (OX40), CD137, CoVaccine HT, copolímeros de bloque no iónicos, adyuvante de Freund incompleto, quimiocinas, toxina del cólera; enterotoxina termolábil de *E. coli*; toxina de pertussis; análogos de péptidos de muramilo, dipéptidos de muramilo, MF59, SAF, complejos inmunoestimulatorios, microesferas biodegradables, polifosfaceno; polinucleótidos sintéticos.

Los adyuvantes adicionales para usar con las composiciones descritas en la presente son adyuvantes que contienen saponinas (por ejemplo, QS21), solas o combinadas con colesterol y fosfolípidos en la forma característica de un ISCOM ("complejo inmunoestimulante", para análisis, ver Barr y Mitchell, *Immunology y Cell Biology* 74: 8-25 (1996); y Skene y Sutton, *Methods* 40: 53-59 (2006)). Estos adyuvantes se denominan en la presente “adyuvantes a base de saponina”. En formas de realización específicas de las composiciones en la presente, las toxinas mutantes y/o proteínas de toxinas se combinan con un adyuvante tipo ISCOM o “ISCOM”, que es un adyuvante de partículas de matriz ISCOM, tal como ISCOMATRIX™, que se elabora sin antígenos (ISCOM™ e ISCOMATRIX™ son marcas registradas de CSL Limited, Parkville, Australia).

Formulaciones

Las formulaciones o composiciones de la invención comprenden una vacuna contra el dengue viva atenuada que comprende al menos un virus vivo atenuado (LAV) del dengue o al menos un flavivirus quimérico vivo atenuado (LACV), un amortiguador a pH alrededor de 6,5 a 8,5, un azúcar, un glicol o alcohol de azúcar, y un derivado de celulosa seleccionado del grupo que consiste en carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), 2-hidroxietilcelulosa (2-HEC), croscarmelosa, y metilcelulosa, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista farmacéutico; opcionalmente un álcali o sal alcalina, y opcionalmente un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro o Glu, o una combinación de estos.

En otro aspecto de la invención, la formulación comprende una vacuna contra el dengue viva atenuada que comprende al menos un virus vivo atenuado (LAV) del dengue o al menos un flavivirus quimérico vivo atenuado en alrededor de 20-200.000.00 (*sic*) pfu/ml, un amortiguador a pH alrededor de 6,5 a 8,5, un azúcar en alrededor de 150-300 mg/ml, un portador seleccionado del grupo que consiste en polivinilpirrolidona (PVP), carboximetilcelulosa, hidroxipropilcelulosa (HPC), hidroxipropilmetilcelulosa (HPMC), 2-hidroxietilcelulosa (2-HEC), croscarmelosa, metilcelulosa, o una sal de estos aceptable desde el punto de vista

farmacéutico, albúmina de suero humano (HSA) y gelatina; opcionalmente, un álcali o sal alcalina en alrededor de 5-100 mM; opcionalmente un aminoácido Gln, Pro o Glu, o una combinación de estos.

En una forma de realización, la vacuna contra el dengue atenuada viva se encuentra a una concentración de 100-10.000.000 pfu/ml, 100-100.000 pfu/ml o 600-20.000 pfu/ml en la formulación. En otra forma de realización, la vacuna contra el dengue atenuada viva se encuentra a una concentración de 200-200.000 pfu/ml, 600-200.000 pfu/ml o 600-100.000 pfu/ml en la formulación.

En formas de realización preferidas, el derivado de celulosa es aniónico y forma una sal, por ejemplo, carboximetilcelulosa de sodio o potasio a alrededor de 0,3-10 mg/ml, 1-10 mg/ml, 3-7 mg/ml o 5 mg/ml en la formulación de la vacuna contra el dengue atenuada viva. La sal de carboximetilcelulosa está disponible en un tipo de alta viscosidad con un peso molecular promedio de alrededor de 700.000; un tipo de viscosidad media con un peso molecular promedio de alrededor de 250.000; y un tipo de baja viscosidad con un peso molecular promedio de alrededor de 90.000. En una forma de realización, el derivado de celulosa es sal de carboximetilcelulosa con un peso molecular promedio de alrededor de 700.000 a alrededor de 0,3-1,5 mg/ml en la formulación de la vacuna contra el dengue atenuada viva. En otra forma de realización, el derivado de celulosa es sal de carboximetilcelulosa con un peso molecular promedio de alrededor de 250.000 a alrededor de 1-4 mg/ml. En una forma de realización, el derivado de celulosa es sal de carboximetilcelulosa con un peso molecular promedio de alrededor de 90.000 a alrededor de 3-7 p 3-10 mg/ml. En aun otra forma de realización, el derivado de celulosa es sal de carboximetilcelulosa con un peso molecular promedio de alrededor de 50.000 a 1000.000 (*sic*) a alrededor de 0,3-10 mg/ml.

En una forma de realización, el amortiguador se selecciona del grupo que consiste en fosfato, succinato, histidina, TRIS, MES, MOPS, HEPES, acetato y citrato a alrededor de 5-300 mM, 5-20 mM, 10-12 mM o 11 mM.

El álcali o la sal alcalina puede proporcionar un efecto estabilizador y se puede seleccionar del grupo que consiste en cloruro de magnesio, cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro de sodio o una combinación de estos a alrededor de 10-150 mM, 10-100 mM, 15-75 mM, 30-90 mM, 75 mM, 50 mM o 30 mM.

El aminoácido se puede seleccionar del grupo que consiste en Val, Ile, Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro o Glu, o una combinación de estos a 10-100, 10-75, 10-50, 20-30 o 25 mM. En otra forma de realización, el aminoácido se puede seleccionar del grupo que consiste en

Ala, Asp, His, Leu, Lys, Gln, Pro o Glu, o una combinación de estos a 10-100, 10-75, 10-50, 20-30 o 25 mM. En una forma de realización, el aminoácido es Lys, Leu o Glu. En otra forma de realización, los aminoácidos son Leu y Glu. En otra forma de realización, el aminoácido es Leu, Lys, Glu o Ala. En otra forma de realización, el aminoácido es Leu.

El azúcar y glicol o alcohol de azúcar puede actuar como crioprotector o excipiente estabilizante. En una forma de realización, el azúcar está a una concentración de 50-300 mg/ml. En otra forma de realización, el azúcar es trehalosa o sacarosa o una combinación de estos a alrededor de 60-120 mg/ml, 90-110 mg/ml o 80-100 mg/ml. En una forma de realización, la relación de sacarosa con respecto a trehalosa es entre 1:1 a 1:4. En otra forma de realización, la sacarosa es 90 mg/ml y la trehalosa es 90-200 mg/ml, y preferentemente, 110 mg/ml. En otra forma de realización, el glicol es propilenglicol, y el alcohol de azúcar es glicerol o sorbitol a alrededor de 2,5-7,5 mg/ml, 3-7 mg/ml o 5 mg/ml.

Las composiciones de la invención se pueden administrar a un sujeto mediante uno o más métodos conocidos por la persona del oficio de nivel medio, tales como por vía parenteral, transmucosa, transdérmica, intramuscular, intravenosa, intradérmica, intranasal, subcutánea, intraperitoneal, y se formulan de manera acorde.

En una forma de realización, las composiciones de la presente invención se administran mediante inyección epidérmica, inyección intramuscular, intravenosa, intraarterial, inyección subcutánea o inyección mucosa intrarrespiratoria de una preparación líquida. Las formulaciones líquidas para inyección incluyen soluciones y similares. La composición de la invención se puede formular como viales de dosis única, viales de dosis múltiples o jeringas prellenadas.

En otra forma de realización, las composiciones de la presente invención se administran por vía oral y, por lo tanto, se formulan en una forma adecuada para la administración oral, es decir, como una preparación sólida o líquida. Las formulaciones orales sólidas incluyen comprimidos, cápsulas, píldoras, gránulos, pelets y similares. Las formulaciones orales líquidas incluyen soluciones, suspensiones, dispersiones, emulsiones, aceites y similares.

En un aspecto de la invención, la formulación es una formulación seca sólida preparada mediante liofilización, congelamiento, secado por microondas o a través de la generación de lioesferas. En una forma de realización, la formulación seca sólida se puede obtener mediante o se puede producir a partir del proceso de secado por microondas descrito en el Ejemplo 7. Las formulaciones se pueden almacenar a -70 °C, -20 °C, 2-8 °C o a temperatura

ambiente (25 o 37 °C). Las formulaciones secas se pueden expresar en términos del peso de los componentes en un vial de dosis unitaria, pero esto varía para diferentes tamaños de vial o dosis. De manera alternativa, las formulaciones secas de la presente invención se pueden expresar en la cantidad de un componente como la relación del peso del componente en comparación con el peso de la sustancia farmacológica (DS) en la misma muestra (por ejemplo, un vial). Dicha relación puede expresarse como un porcentaje. Dichas relaciones reflejan una propiedad intrínseca de las formulaciones secas de la presente invención, independientemente del tamaño del vial, la dosificación y el protocolo de reconstitución. En otras formas de realización, la formulación es en lioesferas.

En otro aspecto de la invención, la formulación es una solución reconstituida. Una formulación seca sólida también se puede reconstituir a diferentes concentraciones según factores clínicos, tales como vía de administración o dosificación. Por ejemplo, una formulación seca se puede reconstituir a una concentración alta (es decir, en un volumen pequeño) de ser necesario para administración subcutánea. También se pueden necesitar altas concentraciones si se requiere una alta dosis para un sujeto particular, en particular, si se administra por vía subcutánea en donde se debe minimizar el volumen de inyección. La dilución posterior con agua o amortiguador isotónico se puede usar entonces fácilmente para diluir el producto farmacológico hasta una concentración menor. Si se desea una isotonicidad a una menor concentración de producto farmacológico, el polvo seco puede reconstituirse en el volumen bajo estándar de agua y luego diluirse de forma adicional con diluyente isotónico, tal como 0,9 % de cloruro de sodio.

La reconstitución generalmente tiene lugar a una temperatura de alrededor de 25 °C para garantizar la hidratación completa, aunque se pueden usar otras temperaturas según se desee. El tiempo necesario para la reconstitución dependerá, por ejemplo, del tipo de diluyente, la cantidad de excipientes y virus o proteína. Los diluyentes de ejemplo incluyen agua estéril, agua bacteriostática para inyección (BWFI), una solución amortiguada de pH (por ejemplo, solución salina amortiguada con fosfato), solución salina estéril, solución de Ringer o solución de dextrosa. El volumen de reconstitución puede ser de alrededor de 0,5-1,0 ml, preferentemente, 0,5 ml o 0,7 ml. En una forma de realización, una dosis única tiene un volumen de 0,5 ml. En otro aspecto, la invención proporciona un método para preparar una formulación líquida que comprende las etapas de reconstitución de las formulaciones de la invención con un diluyente como se describió anteriormente.

En otra forma de realización de la invención, la formulación es la solución acuosa preparada antes de la liofilización, congelado, secado por microondas o generación de lioesferas.

Procesos para preparar las lioesferas

Los procesos para preparar lioesferas se divulgaron en la publicación de patente estadounidense US20140294872, cuya divulgación se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. El método comprende administrar al menos una gota líquida que tiene una forma sustancialmente esférica en una superficie sólida y plana (es decir, que no tiene cavidades para muestras), congelar la gota en la superficie sin poner en contacto la gota con una sustancia criogénica y liofilizar la gota congelada para producir un pelet seco que tiene una forma sustancialmente esférica. La patente estadounidense N.º 9.119.794, cuya divulgación se incorpora en la presente por referencia en su totalidad, también divulga procesos para formar lioesferas. Los volúmenes unitarios que contienen la mezcla de medio acuoso se forman en un elemento sólido que contiene cavidades. El elemento sólido se enfría por debajo de la temperatura de congelamiento de la mezcla, las cavidades se llenan con la mezcla, y la mezcla se solidifica mientras se encuentra presente en la cavidad para formar las formas unitarias. Las formas unitarias se secan al vacío para proporcionar lioesferas.

En otras formas de realización, las lioesferas se producen en una forma sustancialmente esférica y se preparan mediante el congelamiento de gotas de una composición líquida de un material biológico deseado en una superficie plana y sólida, en particular, una superficie que no tiene ninguna cavidad, y luego liofilización de las formas unitarias. La publicación de patente estadounidense N.º US2014/0294872, cuya divulgación se incorpora en la presente por referencia en su totalidad, divulga procesos similares para formar lioesferas.

Brevemente, en algunas formas de realización, el proceso comprende administrar al menos una gota líquida que tiene una forma sustancialmente esférica en una superficie sólida y plana (es decir, que no tiene cavidades para muestras), congelar la gota en la superficie sin poner en contacto la gota con una sustancia criogénica y liofilizar la gota congelada para producir un pelet seco que tiene una forma sustancialmente esférica. El proceso se puede usar en un modo de alto rendimiento para preparar múltiples pelets secos mediante la administración simultánea de la cantidad deseada de gotas en una superficie sólida y plana, el congelamiento de las gotas y la liofilización de las gotas congeladas. Los pelets que se prepararon mediante este proceso de una formulación líquida pueden tener una alta concentración de un material biológico (tal como un agente terapéutico de proteína) y se pueden combinar en un conjunto de pelets secos.

En algunas formas de realización, la superficie sólida y plana es la superficie superior de una placa metálica que comprende una superficie inferior que está en contacto físico con un disipador térmico adaptado para mantener la superficie superior de la placa metálica a una temperatura de -90 ˚C o menor. Como la superficie superior de la placa metálica está muy por debajo del punto de congelamiento de la formulación líquida, la gota se congela casi de manera instantánea cuando la superficie inferior de la gota toca la superficie superior de la placa metálica.

En otras formas de realización, la superficie sólida y plana es hidrófoba y comprende la superficie superior de una película delgada que se mantiene por encima de 0º C durante la etapa de administración. La gota administrada se congela al enfriar la película delgada hasta una temperatura por debajo de la temperatura de congelamiento de la formulación.

Proceso de liofilización

Las formulaciones liofilizadas de la presente invención se forman por liofilización (secado por congelamiento) de una solución de liofilización previa. El secado por congelamiento se logra congelando la formulación y sublimando posteriormente el agua a una temperatura adecuada para un secado primario. Bajo esta condición, la temperatura del producto está por debajo del punto eutéctico o de la temperatura de colapso de la formulación. En general, la temperatura de almacenamiento para el secado primario varía de alrededor de -50 a 25 °C (siempre y cuando el producto permanezca congelado durante el secado primario) a una presión adecuada, que en general varía de alrededor de 30 a 250 mTorr. La formulación, el tamaño y tipo de recipiente que contiene la muestra (por ejemplo, vial de vidrio) y el volumen de líquido determinarán el tiempo necesario para el secado, que puede variar de unas pocas horas a varios días (por ejemplo, 40-60 h). Se puede llevar a cabo una etapa de secado secundario a alrededor de 0-40 °C, que depende principalmente del tipo y tamaño del recipiente y del tipo de proteína empleados. El tiempo de secado secundario depende del nivel de humedad residual deseado en el producto y en general toma al menos alrededor de 5 horas. En general, el contenido de humedad de una formulación liofilizada es menor a alrededor del 5 %, y preferentemente menor a alrededor del 3 %. La presión puede ser la misma que la empleada durante la etapa de secado primario. Las condiciones de secado por congelamiento pueden variar según la formulación, el tamaño del vial y las bandejas de liofilización.

En algunos casos, puede ser deseable liofilizar o secar por microondas la formulación en el recipiente en el que se lleva a cabo la reconstitución con el fin de evitar una

etapa de transferencia. El recipiente en este caso puede ser, por ejemplo, un vial de 2, 3, 5, 10 o 20 ml

Métodos de uso

Algunas formas de realización de la invención también incluyen una o más de las composiciones o formulaciones de vacuna contra el dengue descritas en la presente (i) para usar en, (ii) para usar como medicamento o composición para, o (iii) para usar en la preparación de un medicamento de: (a) tratamiento (por ejemplo, del cuerpo humano); (b) medicina; (c) inhibición de la replicación del virus del dengue, que incluye DEN1, DEN2, DEN3 y/o DEN4; (d) inducción de una respuesta inmunitaria o una respuesta inmunitaria protectora contra uno o más de DEN1, DEN2, DEN3 y/o DEN4; (e) inducción de un anticuerpo neutralizante del virus contra uno o más tipos de dengue; (f) tratamiento o profilaxis de la infección por virus del dengue; (g) prevención de recidiva de la infección por virus del dengue; (h) reducción de la progresión, aparición o gravedad de síntomas patológicos asociados a infección del virus del dengue y/o reducción de la probabilidad de una infección por virus del dengue, (i) tratamiento, profilaxis o retraso en la aparición, gravedad o progresión de enfermedades asociadas al dengue, que incluyen, entre otras: fiebre por dengue, fiebre hemorrágica por dengue y síndrome del shock por dengue. En estos usos, las composiciones de vacuna contra el dengue se pueden usar, opcionalmente, en combinación con uno o más adyuvantes (por ejemplo, AAHS, fosfato de aluminio, hidróxido de aluminio, tal como Alhydrogel®, u otro adyuvante de sal de aluminio, un adyuvante a base de saponina, tal como ISCOMATRIX™ (CSL, Ltd.), un antagonista de TLR, o nanopartículas lipídicas, descritas en la presente).

El tratamiento profiláctico se puede realizar usando una composición de la vacuna contra el virus del dengue de la invención, como se describe en la presente. La composición de la invención se puede administrar a la población general o a aquellas personas con mayor riesgo de infección por dengue, por ejemplo, aquellas personas que viven en o viajan a áreas del mundo en las que predominan los mosquitos del género *Aedes*.

Aquellos "que necesitan tratamiento" incluyen aquellos que ya tienen una infección por dengue (por ejemplo, infectados con uno o más de DEN1, DEN2, DEN3 o DEN4), así como aquellos propensos a tener una infección o cualquier persona en la que se desea una reducción de la posibilidad de infección.

Las composiciones de vacuna contra el virus del dengue de la invención se pueden formular y administrar a un paciente que usa técnicas conocidas en el estado de la técnica. Los lineamientos para la administración farmacéutica en general se proporcionan, por ejemplo, en *Vaccines,* Eds. Plotkin and Orenstein, W.B. Sanders Company, 1999; *Remington's Pharmaceutical Sciences,* 20.ª edición, Ed. Gennaro, Mack Publishing, 2000; y *Modern Pharmaceutics,* 2.ª edición, Eds. Banker and Rhodes, Marcel Dekker, Inc., 1990.

En consecuencia, la invención proporciona un método para inducir una respuesta inmunitaria protectora en un paciente contra una infección por dengue que comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad eficaz desde el punto de vista inmunológico de cualquiera de las composiciones descritas en la presente de vacuna contra el virus del dengue. En una forma de realización, la composición de vacuna contra el virus del dengue se coadministra en combinación con otras vacunas para tratar o prevenir enfermedades de Zika, sarampión, paperas y rubeola, o varicela, etc.

En la invención también se proporciona un método para tratar la infección por dengue o para tratar cualquier afección patológica asociada a la infección por dengue, en donde dicho tratamiento incluye profilaxis de la infección, y reducción en la gravedad de los síntomas clínicos, retraso o prevención de la progresión de la enfermedad, y/o reducción de la posibilidad de infección o de los síntomas clínicos de esta; en donde el método comprende la etapa de administrar al paciente una cantidad eficaz desde el punto de vista inmunológico de cualquiera de las composiciones de vacuna descritas en la presente.

Otras formas de realización de la invención comprenden la administración de dos o más composiciones de la invención a un paciente en un régimen de sensibilización/refuerzo. En consecuencia, la invención se refiere a un método para prevenir o reducir la posibilidad de infección por dengue en un paciente que lo necesita, que comprende las etapas de:

(a) administrar una primera composición de vacuna contra el virus del dengue de la invención al paciente;

(b) esperar que transcurra una cantidad de tiempo predeterminada después de la Etapa (a);

(c) administrar al paciente una segunda composición de vacuna contra el virus del dengue de la invención; y

(d) opcionalmente, repetir las Etapas (b) y (c);

de manera que se previene la infección por dengue o se reduce la posibilidad de infección por dengue en el paciente.

En formas de realización del método anterior, las composiciones de vacuna contra el virus del dengue de la invención son en forma de líquido congelado. En formas de realización alternativas, las composiciones de vacuna contra el virus del dengue se liofilizaron o se secaron por microondas y se reconstituyeron con un diluyente estéril antes de la administración al paciente.

La cantidad de tiempo entre la primera dosis de una composición de vacuna contra el virus del dengue de la invención y la segunda dosis de una composición de vacuna contra el virus del dengue de la invención, o cualquier dosis posterior, es de alrededor de 2 semanas a alrededor de 2 años. En formas de realización preferidas de la invención, puede transcurrir un tiempo de 2 meses a 12 meses entre múltiples administraciones. En formas de realización alternativas de este aspecto de la invención, la cantidad de tiempo entre la

administración de cada dosis de composición vacunal se selecciona independientemente del grupo que consiste en 2 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 5 meses, 6 meses, 7 meses, 8 meses, 9 meses, 10 meses, 11 meses, 12 meses, 13 meses, 14 meses, 15 meses, 16 meses, 17 meses, 18 meses, 19 meses, 20 meses, 21 meses, 22 meses, 23 meses y 24 meses.

En algunas formas de realización de la invención, la primera y la segunda composición de vacuna contra el virus del dengue son iguales. En formas de realización alternativas, la primera y la segunda composición de vacuna contra el virus del dengue no son iguales.

Las composiciones de vacuna contra el virus del dengue de la invención se pueden administrar por distintas vías. En formas de realización preferidas de la invención, las composiciones de la invención se administran por vía parenteral, es decir, mediante inyección intradermal, subcutánea o intramuscular. La administración subcutánea e intramuscular se puede llevar a cabo, por ejemplo, usando agujas o inyectores a presión.

Las composiciones descritas en la presente se pueden administrar de manera compatible con la formulación de dosis, y en una cantidad tal que sea eficaz desde el punto de vista inmunológico para tratar y/o reducir la posibilidad de infección por dengue. La dosis administrada a un paciente, en el contexto de la presente invención, debería ser suficiente para lograr una respuesta beneficiosa en un paciente en el tiempo, tal como una reducción en el nivel de virus del dengue, o para reducir la posibilidad de infección por dengue. La cantidad de vacunas contra el virus del dengue puede depender del sujeto que se debe tratar, lo que incluye su edad, sexo, peso y estado general de salud. En este sentido, las cantidades precisas de la vacuna que necesitan administrarse dependerán del criterio del médico. Al determinar la cantidad eficaz de vacuna a administrar en el tratamiento o profilaxis contra infección por dengue, el médico puede evaluar los niveles de plasma circulante, la progresión de la enfermedad y la producción de anticuerpos anti-dengue. De todos modos, las dosis adecuadas de composiciones inmunógenas de la invención pueden ser determinadas fácilmente por las personas del oficio de nivel medio.

Los regímenes de dosis adecuados se determinan preferentemente teniendo en cuenta factores conocidos en el estado de la técnica, que incluyen edad, peso, sexo o estado de la salud del paciente; vía de administración; efecto deseado; y composición particular utilizada. El tiempo de las dosis depende de factores conocidos en el estado de la técnica, y puede variar de 2 semanas a 24 meses. Después de la administración inicial, se pueden administrar una o más dosis adicionales para mantener y/o reforzar los títulos de anticuerpos.

La invención también se refiere a métodos para prevenir la infección por dengue, o prevenir o mejorar los síntomas de esta, que comprenden las etapas de: administrar, a un paciente en el que se desea prevenir o mejorar la infección por dengue o los síntomas de esta, composiciones de la vacuna contra el virus del dengue. Otras formas de realización de este aspecto de la invención comprenden dejar que pase una cantidad de tiempo predeterminada

después de la administración de la composición de vacuna contra el virus del dengue, y administrar una segunda dosis de una composición de vacuna contra el virus del dengue.

En el método descrito anteriormente, la primera vacuna contra el dengue es, preferentemente, tetravalente y comprende un componente de DEN1, DEN2, DEN3 y DEN, en donde cada componente comprende un virus del dengue vivo atenuado o un flavivirus quimérico vivo atenuado, como se describe en la presente. En formas de realización de ejemplo, la vacuna contra el dengue atenuada viva comprende cuatro flavivirus quiméricos; en donde cada uno de los flavivirus quiméricos comprende las proteínas de prM y E de un único serotipo de virus del dengue y la cápside y proteínas no estructurales de un flavivirus diferente, en donde se atenúan cada uno de los flavivirus quiméricos. En algunas formas de realización, la cápside y las proteínas no estructurales de los cuatro flavivirus quiméricos son del virus de la fiebre amarilla. En formas de realización alternativas, la cápside y las proteínas no estructurales de los cuatro flavivirus quiméricos son de un serotipo de dengue diferente a las proteínas de prM y E.

En algunas formas de realización de este aspecto de la invención, la segunda vacuna contra el dengue es una vacuna de subunidades recombinante contra el dengue tetravalente que comprende las proteínas de E del dengue, o fragmentos de estas, de DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4. Las vacunas de subunidades útiles en este método de la invención se describen en la presente. En formas de realización preferidas, las proteínas de E constituyen cada una alrededor de 80 % de la longitud de E de tipo silvestre de DEN1, DEN2, DEN3 y DEN4, comenzando con el residuo de aminoácido 1 en su terminal N.

EJEMPLOS

Los ejemplos de secuencias de virus del dengue vivo atenuado usadas en estos estudios son rDEN1 - rDEN1Δ30-1545 PMVS (SEQ ID NO: 6); rDEN2 – rDEN2/4 Δ 30(ME)-1495,7163 PMVS (SEQ ID NO: 7); rDEN3 – rDEN3Δ30/31-7164 PMVS (SEQ ID NO: 8); y rDEN4 – rDEN4 Δ 30-7132,7163,8308 PMVS (SEQ ID NO: 9).

Tabla 1: Síntesis de cambios de secuencia de PMVS DENV1

Cantidad de nucleótidos	Gen	Cambio de nucleótidos		Cantidad de aminoácidos de la proteína	Cambio de aminoácidos	
		wt	PMVS		wt	PMVS
1544*	E	A	C	484	Lys	Arg
1545	E	A	G	484	Lys	Arg
1549*	E	A	G	485	Ser	Ser

*Introducido para fines de estabilización y clonación

Tabla 2: Síntesis de cambios de secuencia de PMVS DENV2

Cantidad de nucleótidos	Gen	Cambio de nucleótidos		Cantidad de aminoácidos de la proteína	Cambio de aminoácidos	
		Clon de cADN original	PMVS		Clon de cADN original	PMVS
183	C	T	C	28	Leu	Leu
1490	E	G	A	184	Glu	Glu
1495	E	C	U	186	Ser	Phe
7132	NS4b	C	U	102	Thr	Ile
7163	NS4b	A	C	112	Leu	Phe
7166	NS4b	C	G	113	Val	Val
7169	NS4b	T	C	114	His	His

Tabla 3: Síntesis de cambios de secuencia de PMVS DENV3

Cantidad de nucleótidos	Gen	Cambio de nucleótidos		Cantidad de aminoácidos de la proteína	Cambio de aminoácidos	
		wt	PMVS		wt	PMVS
1539	E	A	G	202	Lys	Arg
1681	E	A	G	250	Val	Val
2095	E	C	U	388	Ile	Ile
7164	NS4b	T	C	115	Val	Ala
7304	NS4b	T	C	162	Ser	Pro
8082	NS5	A	G	173	Lys	Arg
10533	UTR 3’	G	A	N/A	N/A	N/A

Tabla 4: Síntesis de cambios de secuencia de PMVS DENV4

Cantidad de nucleótidos	Gen	Cambio de nucleótidos		Cantidad de aminoácidos de la proteína	Cambio de aminoácidos	
		Clon de cADN original	PMVS		Clon de cADN original	PMVS
2440	NS1	T	C	6	Val	Ala
7132	NS4b	C	U	102	Thr	Ile
7153	NS4b	T>C	U	109	Val>Ala	Val

7163	NS4b	A	C	112	Leu	Phe
8308	NS5	A>G	G	249	Lys>Arg	Arg

DENV1, 2, 3 y 4 de tipo silvestre y clon de cADN original en las tablas anteriores corresponden al serotipo de virus del dengue descrito en Whitehead, S. S. et al., J Virol 77:1653-1657 (2003); Blaney, J. E. et al. The American journal of tropical medicine and hygiene 71:811-821 (2004); Blaney, J. E., Jr. et al., BMC Infect Dis 4:39 (2004); Durbin, A. P. et al., The American journal of tropical medicine and hygiene 65:405-413 (2001).

Las versiones anteriores del virus del dengue atenuado vivo se mencionan como DENV1 o DEN1, DENV2 o DEN2, DENV3 o DEN3 y DENV4 o DEN4 más adelante en los Ejemplos. Para los Ejemplos 1-6, las formulaciones tenían una potencia de $2x10^5$ pfu/ml de cada uno de DENV1, DENV2, DENV3 o DENV4. Para los Ejemplos 7-10, las formulaciones tenían una potencia de $1,5x10^5$ pfu/ml de cada uno de DEN1, DEN2, DEN3 o DEN4.

EJEMPLO 1

Efecto de CMC, PG y aminoácidos (en comparación con la formulación Dengvaxia®) en DENV4

Se llevaron a cabo tres estudios separados para investigar los efectos de distintos excipientes en el rendimiento de liofilización y la estabilidad de DENV4. Las formulaciones se enumeraron en la Tabla 5.

Tabla 5: Composiciones de las formulaciones

Número de Formulación	Composición
1	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 30 mM de cloruro de sodio pH 7,5
2	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa pH 7,5
3	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 75 mM de cloruro de sodio pH 7,5
4	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 75 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio pH 7,5
5	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 75mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol pH 7,5
13	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 25 mg/ml de sorbitol, 75 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio pH 7,5
18	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 50 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol, 25 mM de L arginina pH 7,5
19	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 50 mM de cloruro de sodio,

	5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol, 25 mM de ácido L glutámico pH 7,5
20	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 50 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol, 25 mM de L leucina pH 7,5
21	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 50 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol, 25 mM de L prolina pH 7,5
22	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 75 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de glicerol pH 7,5
25	11 mM de TRIS, 90 mg/ml de sacarosa, 75 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol pH 7,5
26	6 mM de TRIS, 37,5 mg/ml de sorbitol, 75 mg/ml de sacarosa, 55 mg/ml de trehalosa, 2,5 mg/ml de urea, 15 mg/ml de mezcla de aminoácidos ǂ
45	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 50 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol pH 7,5
46	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 30 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol pH 7,5
47	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 15mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol pH 7,5
50	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 50 mM de cloruro de potasio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol pH 7,5
55	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 75 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de glicerol, 5 mg/ml de urea pH 7,5
56	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 201 mg/ml de medio L-15 de Leibovitz sin fenol rojo*, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol pH 7,5
57	5,5 mM de TRIS, 5,5 mM de L histidina, 90 mg/ml de sacarosa, 50 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol, 25 mM de L leucina pH 7,5
81	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 75 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol, 25 mM de L leucina pH 7,5
98	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 50 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol, 25 mM de L leucina, 0,01 % de poloxámero 188 pH 7,5

104	11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 50 mM de cloruro de sodio, 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio, 5 mg/ml de propilenglicol, 25 mM de L leucina, 25 mM de ácido L glutámico pH 7,5

*Medio L-15 de Leibovitz sin fenol rojo es una solución fabricada por Hyclone Laboratories, Inc.

Estudio 1: DENV4 se formuló en 11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa y 75 mM de NaCl (Formulación 3), con la adición de 5 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio (CMC de sodio) (Formulación 4) o adición de 5 mg/ml de CMC de sodio y 5 mg/ml de propilenglicol (Formulación 5).

Estudio 2: La Formulación 5 se evaluó contra otras formulaciones comparables que contenían 25 mM de leucina (Formulación 20) o 25 mM de prolina (Formulación 21), así como también 11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 50 mM de NaCl, 5 mg/ml de CMC de sodio y 5 mg/ml de propilenglicol.

Estudio 3: La Formulación 20 se evaluó contra una formulación comparable que contenía 11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 50 mM de NaCl, 5 mg/ml de CMC de sodio y 5 mg/ml de propilenglicol y 25 mM de ácido glutámico (Formulación 19) y la formulación Dengvaxia® (Formulación 26), que consiste en 37,5 mg/ml de sorbitol, 75 mg/ml de sacarosa, 55 mg/ml de trehalosa, 25 mg/ml de urea, 6 mM de TRIS, 15mg/ml de una mezcla de aminoácidos.

Para todos los estudios, las muestras se congelaron y una parte se almacenó a -70 °C como controles líquidos congelados y otra parte se liofilizó. Después de la liofilización, algunas muestras se almacenaron a -70 °C como control y el resto se almacenó a 25 °C durante 1 semana. Después de la incubación, las muestras a 25°C se congelaron y se evaluaron con un ensayo de infectividad relativa de dengue (DRIA) junto con los controles líquidos congelados y los controles liofilizados congelados. Se evaluaron dos viales individuales de cada muestra.

DRIA es un ensayo de infectividad relativa a base de células usado para medir la infectividad de las muestras de formulación del virus del dengue en función de la expresión de proteína de envoltura. Las células Vero se colocaron en placas de microtitulación de 96 cavidades, se incubaron durante 24 horas, y luego se infectaron con diluciones en serie de estándar de referencia y control positivo de DEN1, DEN2, DEN3 y/o DEN4 específicos para el serotipo evaluado además de los artículos de prueba. Las células infectadas se incubaron durante 48 horas y luego se fijaron con una solución diluida de formaldehído. Las células fijadas luego se permeabilizaron antes de agregar anticuerpo primario (mAb específico para serotipo anti-DEN

en conejo) a las placas e incubar durante la noche. Después de lavar las placas, el anticuerpo secundario (IgG anti-conejo conjugado con NL637 en asno, R&D Systems) se agregó a las cavidades y se incubó a temperatura ambiente durante > 2 h. Después de lavar las placas, se agregó PBS a las cavidades en preparación para análisis de imágenes mediante el lector de imágenes MiniMax (Molecular Devices). La potencia relativa (% de RP) de las muestras (relativa al estándar de referencia) se calculó usando el software SoftMAX Pro (Molecular Devices) mediante un ajuste de curva logística de 4 parámetros reducida.

Los rendimientos de liofilización se calcularon al dividir el resultado de infectividad liofilizada por el resultado de infectividad del control líquido congelado. Para calcular la pérdida de log luego de almacenamiento a 25 °C durante una semana, los valores de infectividad se convirtieron a la escala log y el resultado log de 1 semana a 25°C se sustrajo del resultado de control liofilizado a -70 °C para cada formulación.

Se observó un efecto sinérgico en la combinación de CMC de sodio y propilenglicol, que tuvo como resultado un mayor rendimiento de liofilización y estabilidad. La adición de leucina mejoró aún más el rendimiento y la estabilidad. Las formulaciones que contenían CMC de sodio, propilenglicol y leucina o ácido glutámico proporcionaron un mayor rendimiento de liofilización que la formulación Dengvaxia. Ver Figuras 1-2. El punto temporal de estabilidad de 1 semana a 25 °C para la Formulación 26 no se evaluó debido a colapso de torta después de almacenamiento a 25 °C.

EJEMPLO 2

Efecto del alcohol de azúcar en DENV4:

DENV4 se formuló en una formulación base de 11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 75 mM de NaCl y 5 mg/ml de CMC de sodio pH 7,5 con 5 mg/ml de propilenglicol (Formulación 5), 5 mg/ml de glicerol (Formulación 22), o 25 mg/ml de sorbitol (Formulación 13) como alcoholes de azúcar.

Las muestras se congelaron y una parte se almacenó a -70 °C como controles líquidos congelados y otra parte se liofilizó. Después de la liofilización, algunas muestras se almacenaron a -70 °C y el resto se almacenó a 25 °C durante 1 semana. Después de la incubación, las muestras a 25°C se congelaron y se evaluaron con un ensayo de infectividad relativa de dengue junto con los controles líquidos congelados y los controles liofilizados congelados. Se evaluaron dos viales individuales de cada muestra.

Los rendimientos de liofilización se calcularon al dividir el resultado de infectividad liofilizada por el resultado de infectividad del control líquido congelado. Para calcular la pérdida

de log luego de almacenamiento a 25 °C durante una semana, los valores de infectividad se convirtieron a la escala log y el resultado log de 1 semana a 25°C se sustrajo del resultado de control liofilizado a -70 °C para cada formulación.

Este ejemplo demuestra que tanto el propilenglicol como el glicerol mejoraron el rendimiento de liofilización y la estabilidad de DENV4 en comparación con sorbitol (ver Figuras 3 y 4).

EJEMPLO 3

Efecto de pH en DENV4:

DENV4 se formuló en la Formulación 22 (11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 75 mM de NaCl, 5 mg/ml de CMC de sodio, 5 mg/ml de glicerol a pH 7,0, 7,5 o 8,0).

Las muestras se congelaron y una parte se almacenó a -70 °C como controles líquidos congelados y otra parte se liofilizó. Después de la liofilización, algunas muestras se almacenaron a -70 °C y el resto se almacenó a 25 °C durante 1 semana. Después de la incubación, las muestras a 25°C se congelaron y se evaluaron con un ensayo de infectividad relativa de dengue junto con los controles líquidos congelados y los controles liofilizados congelados. Se evaluaron dos viales individuales de cada muestra.

Los rendimientos de liofilización se calcularon al dividir el resultado de infectividad liofilizada por el resultado de infectividad del control líquido congelado. Para calcular la pérdida de log luego de almacenamiento a 25 °C durante una semana, los valores de infectividad se convirtieron a la escala log y el resultado log de 1 semana a 25°C se sustrajo del resultado de control liofilizado a -70 °C para cada formulación.

Las Figuras 5 y 6 demuestran que DENV4 se puede formular en la Formulación 22 de pH 7,0 a pH 8,0.

EJEMPLO 4

Efecto de amortiguador en DENV4:

En el Estudio 1, DENV4 se formuló en una formulación base de 90 mg/ml de sacarosa, 75 mM de NaCl, 5 mg/ml de CMC de sodio, y 5 mg/ml de glicerol con sistemas amortiguadores alternativos ajustados a pH 7,5. La Formulación 22 contenía 11 mM de fosfato de potasio y la Formulación 25 contenía 11mM de TRIS además de la formulación base.

En el Estudio 2, DENV4 se formuló en una formulación base de 90 mg/ml de sacarosa, 75 mM de NaCl, 5 mg/ml de CMC de sodio, y 5 mg/ml de propilenglicol con sistemas amortiguadores alternativos ajustados a pH 7,5. La Formulación 5 contenía 11 mM de fosfato de potasio y la Formulación 57 contenía una combinación de 5,5 mM de histidina y 5,5 mM de TRIS además de la formulación base.

Las muestras se congelaron y una parte se almacenó a -70 °C como controles líquidos congelados y otra parte se liofilizó. Después de la liofilización, algunas muestras se almacenaron a -70 °C y el resto se almacenó a 25 °C durante 1 semana. Después de la incubación, las muestras a 25°C se congelaron y se evaluaron con un ensayo de infectividad relativa de dengue junto con los controles líquidos congelados y los controles liofilizados congelados. Se evaluaron dos viales individuales de cada muestra.

Los rendimientos de liofilización se calcularon al dividir el resultado de infectividad liofilizada por el resultado de infectividad del control líquido congelado. Para calcular la pérdida de log luego de almacenamiento a 25 °C durante una semana, los valores de infectividad se convirtieron a la escala log y el resultado log de 1 semana a 25°C se sustrajo del resultado de control liofilizado a -70 °C para cada formulación.

Las Figuras 7 y 8 demuestran que DENV4 se puede formular en una variedad de sistemas amortiguadores a pH 7,5 que incluyen fosfato de potasio, TRIS, o una combinación de histidina y TRIS.

EJEMPLO 5

Efecto de NaCl en DENV4:

DENV4 se formuló en una formulación base de 11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 5 mg/ml de CMC de sodio y 5 mg/ml de propilenglicol con un rango de concentración de NaCl de 15-75 mM.

Las muestras se congelaron y una parte se almacenó a -70 °C como controles líquidos congelados y otra parte se liofilizó. Después de la liofilización, algunas muestras se almacenaron a -70 °C y el resto se almacenó a 25 °C durante 1 semana. Después de la incubación, las muestras a 25°C se congelaron y se evaluaron con un ensayo de infectividad relativa de dengue junto con los controles líquidos congelados y los controles liofilizados congelados. Se evaluaron dos viales individuales de cada muestra.

Los rendimientos de liofilización se calcularon al dividir el resultado de infectividad liofilizada por el resultado de infectividad del control líquido congelado. Para calcular la pérdida de log luego de almacenamiento a 25 °C durante una semana, los valores de infectividad se convirtieron a la escala log y el resultado log de 1 semana a 25°C se sustrajo del resultado de control liofilizado a -70 °C para cada formulación.

Las Figuras 9 y 10 muestran que el rendimiento de liofilización y la estabilidad de DENV4 durante 1 semana a 25 °C fueron similares cuando la concentración de NaCl varió de 15 a 75 mM.

EJEMPLO 6

Efecto de propilenglicol y glicerol en todos los serotipos de dengue:

DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4 se prepararon como productos farmacológicos monovalentes en la Formulación 5 (11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 75 mM de NaCl, 5 mg/ml de CMC, 5 mg/ml de propilenglicol), Formulación 20 (11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 50 mM de NaCl, 5 mg/ml de CMC, 5 mg/ml de propilenglicol y 25 mM de leucina) y la Formulación 22 (11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 75 mM de NaCl, 5 mg/ml de CMC, 5 mg/ml de glicerol) a pH 7,5.

Las muestras se congelaron y una parte se almacenó a -70 °C como controles líquidos congelados y otra parte se liofilizó. Después de la liofilización, algunas muestras se almacenaron a -70 °C y el resto se almacenó a 25 °C durante 1 semana. Después de la incubación, las muestras a 25°C se congelaron y se evaluaron con un ensayo de infectividad relativa de dengue junto con los controles líquidos congelados y los controles liofilizados congelados. Se evaluaron dos viales individuales de cada muestra.

Los rendimientos de liofilización se calcularon al dividir el resultado de infectividad liofilizada por el resultado de infectividad del control líquido congelado. Para calcular la pérdida de log luego de almacenamiento a 25 °C durante una semana, los valores de infectividad se convirtieron a la escala log y el resultado log de 1 semana a 25°C se sustrajo del resultado de control liofilizado a -70 °C para cada formulación.

Las Figuras 11 y 12 muestran que el propilenglicol y el glicerol estabilizan los cuatro serotipos en combinación con sacarosa, NaCl y CMC de sodio.

EJEMPLO 7

SPG (sacarosa, fosfato de potasio, ácido glutámico) se elaboró como una solución 10X con la concentración que se observa en la Tabla 6 a continuación.

Tabla 6

Sacarosa (cristales)	746,2 mg/ml
KH_2PO_4 (monobásico, anhidro)	5,17 mg/ml
K_2HPO_4 (dibásico, anhidro)	12,54 mg/ml
Ácido L-glutámico (sal de monosodio, monohidrato)	11,2 mg/ml

También se elaboraron las soluciones indicadas a continuación: 650 mg/ml de sacarosa, 650 mg/ml de trehalosa, dihidrato, 200 mg/ml de gelatina, 150 mg/ml de arginina y 20 mg/ml de albúmina de suero humano (HSA).

SPG, sacarosa, trehalosa, gelatina, arginina y HSA se filtraron con filtros PES 0,22 µm de Stericup. Las soluciones, L-15 de Leibovitz y DEN1 se combinaron para obtener las formulaciones finales que se muestran a continuación:

Tabla 7

N.º de Rx	Formulaciones
1	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa
2	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 175 mg/ml de trehalosa
4	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 175 mg/ml de trehalosa, 2,5 mg/ml de HAS
5	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 175 mg/ml de trehalosa, 25 mg/ml de gelatina
6	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 150 mg/ml de sacarosa
7	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 75 mg/ml de trehalosa
9	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 75 mg/ml de trehalosa, 40 mg/ml de arginina
11	450 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa
12	450 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 175 mg/ml de trehalosa, 25 mg/ml de gelatina
13	450 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 75 mg/ml de trehalosa, 40 mg/ml de arginina

Las formulaciones se cargaron en viales de vidrio 2R a una carga de 0,5 ml y se congelaron a -115 °C durante 15 minutos. Una vez congelados, los viales se secaron en un secador al vacío por microondas (MVD). Una vez secos, algunos viales se colocaron en estabilidad a 25 °C durante 1 semana. Luego, los viales se sometieron a pruebas de potencia usando el ensayo de infectividad relativa de dengue (DRIA).

Proceso de secado por microondas

El material que se secó en el secador al vacío por microondas (MVD) se congeló por corriente de aire y se cargó inmediatamente en una cámara de secado. El vacío se colocó rápidamente en la cámara a menos de 100 mTorr. Una vez alcanzado el valor de consigna del vacío, se seleccionaron los magnetrones (es decir, la cantidad de magnetrones y salida de energía) para comenzar a secar el material. El microondas (se aplica radiación en un formato de onda progresiva) se operó en modo de barrido con un algoritmo que crea ciclos de magnetrones seleccionados (por ejemplo, 2 magnetrones de un total de 4 magnetrones) que se activan y desactivan cada 30 segundos para distribución uniforme de la energía. Asimismo, una carga de

agua sobre la unidad permite un solo pase de microondas a través de una muestra que minimiza cualquier interferencia de microondas reflejadas, por lo que permite la sublimación controlada. La energía se aumentó a través del ciclo de secado para alcanzar una temperatura terminal final de 30-45 °C. Una vez secado, el vacío se rompió en la cámara y el material se selló.

Tabla 8

N.º de Rx	1	2	4	5	6	7	9	11	12	13
Rx	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 175 mg/ml de trehalosa	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 175 mg/ml de trehalosa, 2,5 mg/ml de HSA	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa , 175 mg/ml de trehalosa, 25 mg/ml de gelatina	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 150 mg/ml de sacarosa	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 75 mg/ml de trehalosa	250 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 75 mg/ml de trehalosa, 40 mg/ml de arginina	450 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa	450 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 175 mg/ml de trehalosa, 25 mg/ml de gelatina	450 mg/ml de L-15, 11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 75 mg/ml de trehalosa, 40 mg/ml de arginina
Rendimiento de F/T (%)	55	88	142	102	61	69	53	23	98	29
Rendimiento de secado (%)	62	59	67	83	64	78	6	167	98	10
Pérdida de log promedio	0,45	0,26	0,23	0,19	0,33	0,35	3,65	0,36	0,27	2,11

El rendimiento de congelamiento/descongelamiento (F/T), rendimiento de secado y pérdida de log a 25 °C durante 1 semana se determinaron para todas las formulaciones. El rendimiento de congelamiento/descongelamiento (F/T) se calculó al dividir la potencia relativa informada por la potencia relativa esperada para los controles congelados a -70 °C. El rendimiento de secado se calculó al dividir la potencia relativa del material seco por la potencia relativa del control congelado. La pérdida de log se calculó al convertir la potencia relativa del punto temporal T0 del material seco y el material en estabilidad de 1 semana a 25 °C en logs

mediante un cálculo Log10. Una vez que los números se convirtieron a log, el punto temporal de estabilidad se sustrajo del punto temporal T0 para determinar la pérdida de log a 25 °C durante 1 semana.

Las Formulaciones 2, 4, 5 y 12 mostraron la mejor combinación de rendimiento de F/T, rendimiento de secado y pérdida de log a 25 °C durante una semana. Las cuatro formulaciones contenían ≥25 % de disacárido (sacarosa y/o trehalosa).

Tabla 9: Síntesis de rangos de excipientes de las formulaciones en la Tabla 7

Excipientes	**Cantidad (por dosis de 0,5 ml)**
Sacarosa	37,5 mg-75 mg
Fosfato de potasio (monobásico, anhidro)	~0,26 mg
Fosfato de potasio (dibásico, anhidro)	~0,63 mg
Ácido L-glutámico (sal de monosodio, monohidrato)	0,56 mg
Trehalosa	37,5 mg-87,5 mg
Albúmina de suero humano (HSA)	1,25 mg
Arginina	20 mg
Gelatina	12,5 mg

EJEMPLO 8

SPG (sacarosa, fosfato de potasio, ácido glutámico) se elaboró de acuerdo con el Ejemplo 7.

También se elaboraron las soluciones indicadas a continuación: 650 mg/ml de sacarosa, 650 mg/ml de trehalosa, 5M de cloruro de sodio (NaCl) y 10 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio (CMC de sodio).

Todas las soluciones se filtraron con filtros PES 0,22µm de Stericup. Las soluciones y los virus del dengue DEN1 o DEN4 se combinaron para obtener las formulaciones finales observadas en la tabla de resultados.

Las formulaciones se cargaron en viales de vidrio 2R a una carga de 0,5 ml y se congelaron a -115 °C durante 15 minutos. Una vez congelados, los viales se secaron en un secador al vacío por microondas (MVD). Una vez secos, algunos viales se colocaron en estabilidad a 25 °C durante 1 semana. Luego, los viales se sometieron a pruebas de potencia usando el ensayo de infectividad relativa de dengue (DRIA).

Tabla 10

Formulaciones	DEN1 Pérdida de log promedio 25 °C 1 semana	DEN4 Pérdida de log promedio 25 °C 1 semana	Humedad residual (%)
11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 175 mg/ml de trehalosa	0,55	0,55	5,65±0,75
11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 175 mg/ml de trehalosa, 30 mM de NaCl	0,46	0,54	5,61±0,40
11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 175 mg/ml de trehalosa, 30 mM de NaCl, 5 mg/ml de CMC de sodio	0,60	0,59	4,58±0,33
11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 75 mg/ml de trehalosa	1,12	0,95	3,71±0,22
11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 75 mg/ml de trehalosa, 30 mM de NaCl	0,96	0,51	4,75±0,54
11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de sacarosa, 75 mg/ml de trehalosa, 30 mM de NaCl, 5 mg/ml de CMC de sodio	1,07	0,65	3,98±0,01
11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de trehalosa	0,83	1,82	2,20±0,12
11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 75 mg/ml de trehalosa, 30 mM de NaCl	1,18	1,33	3,43±0,19

La pérdida de log se calculó al convertir la potencia relativa del punto temporal T0 del material seco y el material en estabilidad de 1 semana a 25 °C en logs mediante un cálculo Log10. Una vez que los números se convirtieron a log, el punto temporal de estabilidad se sustrajo del punto temporal T0 para determinar la pérdida de log a 25 °C durante 1 semana.

Los resultados mostraron que, para las formulaciones de DEN1 que contenían ≥ 25 % de disacáridos, se observó la menor pérdida de log a 25°C en 1 semana. Las formulaciones de DEN4 con ≥ 15 % de disacáridos y 30 mM de sal tuvieron la menor pérdida de log a 25 °C en una semana. Para formulaciones que contenían ≥ 15 % de disacáridos y sal, la adición de CMC de sodio ayudó a reducir la humedad residual.

Tabla 11: Síntesis de rangos de excipientes de las formulaciones en la Tabla 10

Excipientes	**Cantidad (por dosis de 0,5 ml)**
Sacarosa	0 mg-37,5 mg

Fosfato de potasio (monobásico, anhidro)	~0,26 mg
Fosfato de potasio (dibásico, anhidro)	~0,63 mg
Ácido L-glutámico (sal de monosodio, monohidrato)	0,56 mg
Trehalosa	37,5 mg-87,5 mg
Carboxilmetilcelulosa de sodio	2,5 mg
Cloruro de sodio	0,88 mg

EJEMPLO 9

Las formulaciones fueron 1x SPG (11 mM de fosfato de potasio, 6 mM de ácido L-glutámico, 0,22 M de sacarosa) con distintas cantidades de L-15 (90 %, 45 % y 25 %) y DEN1, DEN2, DEN3 o DEN4. El principal componente en L-15 de Leibovitz es NaCl (137,39 mM). Por lo tanto, 90 % de L-15 es igual a 123,65 mM de NaCl, 45 % de L-15 es igual a 61,83 mM de NaCl y 25 % de L-15 es igual a 34,35 mM de NaCl.

Las formulaciones se cargaron en viales de vidrio 2R a una carga de 0,5 ml y se congelaron a -115 °C durante 15 minutos. Una vez congelados, los viales se secaron en un secador al vacío por microondas (MVD). Luego, los viales se sometieron a pruebas de potencia usando el ensayo de infectividad relativa de dengue (DRIA).

Las formulaciones que se secaron rápido mediante MVD fueron más estables que las formulaciones secadas en forma más lenta mediante liofilización (Ver Figuras 13-16). En la formulación anterior, la concentración de sal de ≥ 61,83 mM de NaCl pareció mejorar la estabilidad de DEN4 durante el secado, lo que no se observó en los otros tres tipos (DEN1, DEN2 y DEN3).

EJEMPLO 10

También se elaboraron las soluciones indicadas a continuación: 500 mg/ml de sacarosa, 250 mg/ml de trehalosa, 1M de cloruro de sodio (NaCl) y 10 mg/ml de carboximetilcelulosa de sodio (CMC de sodio), 100mg/ml de polivinilpirrolidona (PVP), 100 mM de fosfato de potasio, 500 mg/ml de propilenglicol y agua estéril.

Todas las soluciones se filtraron con filtros PES 0,22µm de Stericup. Las soluciones y el virus del dengue (DEN1) se combinaron para obtener las siguientes formulaciones: 11 mM de fosfato de potasio, 90 mg/ml de sacarosa, 5 mg/ml de CMC de sodio, 5 mg/ml de PG; 11 mM de

fosfato de potasio, 200 mg/ml de sacarosa, 50 mg/ml de PVP K12; 11 mM de fosfato de potasio, 75 mg/ml de sacarosa, 175 mg/ml de trehalosa, 30 mM de NaCl, 5 mg/ml de CMC.

Las formulaciones se cargaron en viales de vidrio 2R a una carga de 0,5 ml y se congelaron a -115 °C durante 15 minutos. Una vez congelados, los viales se secaron en un secador al vacío por microondas (MVD) o un liofilizador (Lio). Luego, los viales se sometieron a pruebas de potencia usando el ensayo de infectividad relativa de dengue (DRIA).

La Figura 17 muestra que la potencia relativa de los viales para las formulaciones secadas en el secador al vacío por microondas es mayor o igual a aquellos secados en el liofilizador.

Tabla 12: Síntesis de rangos de excipientes de las formulaciones en la Figura 7

Excipientes	**Cantidad (por dosis de 0,5 ml)**
Sacarosa	37,5 mg-100 mg
Fosfato de potasio (monobásico, anhidro)	~0,26 mg
Fosfato de potasio (dibásico, anhidro)	~0,63 mg
Trehalosa	87,5 mg
Carboximetilcelulosa de sodio	2,5 mg
Cloruro de sodio	0,88 mg
PVP K12	25 mg
Propilenglicol	2,5 mg

EJEMPLO 11

Las formulaciones tetravalentes (Formulación 20) de DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4 se liofilizaron y se almacenaron a 37 °C durante una semana (Figura 18A), 25 °C durante un mes (Figura 18B) y 2-8 °C durante 18 meses (Figuras 19A-D). La potencia se analizó mediante ensayo de placas (como se describió anteriormente en el texto) en cada punto temporal. Una muestra de control almacenada a -70 °C se evaluó mediante ensayo de placas en el mismo ensayo llevado a cabo como cada punto temporal de estabilidad. Se calculó una pérdida de log para cada punto temporal al sustraer el resultado del log de la muestra de estabilidad de la muestra de control a -70 °C. Las Figuras 18A-B y 19A-D mostraron la pérdida de log en el tiempo para cada uno de los serotipos en la Formulación 20 tetravalente. Las barras de error indican dos errores estándar de la media de la pérdida de log calculada en cada punto temporal. La Formulación 20 proporciona estabilidad térmica a los cuatro serotipos de dengue en la vacuna tetravalente a 37 °C, 25 °C y 2-8 °C como demostró la mínima pérdida de potencia observada en 1 semana, 1 mes y 18 meses, respectivamente.

EJEMPLO 12

Ensayo de placas de alto rendimiento

El ensayo de placas de alto rendimiento conocido como ensayo de "microplacas (uP)" es un ensayo de placas de dengue miniaturizado automático llevado a cabo en microplacas de 96 cavidades. Brevemente, las células Vero se sembraron en placas de cultivo de tejidos de fondo transparente con paredes negras en SFM OptiPro con 2 % de L-glutamina a 40.000 células por cavidad. Las células se unieron durante la noche a 37 °C, 5 % de pCO_2, >90 % de rH. El virus se diluyó previamente en medio sérico reducido de OptiMEM y también se diluyó en serie 1:2 en medio en placas de unión ultrabajas. El medio se retiró de las placas celulares usando aspiración suave, y 25 µl/cavidad de inóculo se transfirió de la placa de dilución en serie a la placa celular. La adsorción viral siguió durante 4 horas a 37 °C, 5 % de pCO_2, >90 % de rH. Luego de la incubación de adsorción, 175 µl/cavidad de medio de superposición se agregó a las cavidades para inhibir la secreción viral y la expansión. Según el serotipo, la infección siguió durante 2 o 3 días más en las condiciones de incubación antes mencionadas.

Luego de la incubación de infección, el medio de superposición se retiró y las células se fijaron con 3,7 % de formaldehído en PBS. Las placas se permeabilizaron con 0,5 % de Triton X-100 en PBS, luego se bloquearon con 1 % de BSA en PBS. Se usaron anticuerpos monoclonales de conejo de tipo específico, y luego AlexaFluor488 anti-conejo, para teñir de manera fluorescente las placas virales. Las placas se sometieron a generación de imágenes mediante Perkin Elmer EnSight y las placas fluorescentes se contaron mediante un algoritmo de recuento automático. El título se determinó usando la ecuación indicada a continuación de las cavidades que contenían recuentos de objetos válidos que estaban dentro de los criterios de recuento (dependiente del tipo):

$$Título\ viral\ \left(\frac{PFU}{ml}\right) = \frac{placas\ contadas}{volumen\ de\ inóculo\ (ml)} \times dilución\ total$$

Se llevaron a cabo dos estudios en donde las formulaciones tetravalentes de DENV1, DENV2, DENV3 y DENV4 se liofilizaron en formulaciones detalladas en la Tabla 13 y se almacenaron a 25 °C durante una semana. Cada formulación contenía 9 % de sacarosa, 11 mM de fosfato de potasio, 50 mM de NaCl, 25 mM de Leu a pH 7,5 y distintas cantidades de CMC o PG. La potencia se analizó mediante el ensayo de placas de alto rendimiento descrito anteriormente en cada punto temporal. Una muestra de control almacenada a -70 °C también se evaluó en el ensayo. Se calculó una pérdida de log para cada punto temporal al sustraer el resultado del log de la muestra de estabilidad de la muestra de control a -70 °C. Las Tablas 14a y

14b mostraron la pérdida de log en el tiempo para cada uno de los serotipos en las distintas formulaciones tetravalentes. Las concentraciones de 0,2 % - 1 % de CMC o PG en distintas combinaciones muestran estabilidad similar entre sí y mayor estabilidad que formulaciones sin la combinación.

Tabla 13. Formulaciones tetravalentes

Formulación completa	Variaciones de la formulación	Número de Formulación
9 % de sacarosa, 11 mM de fosfato de potasio, 50 mM de NaCl, 25 mM de Leu, pH 7,5	Sin CMC o PG	140
9 % de sacarosa, 11 mM de fosfato de potasio, 0,5 % de CMC, 50 mM de NaCl, 25 mM de Leu, pH 7,5	Solo CMC	141
9 % de sacarosa, 11 mM de fosfato de potasio, 0,2 % de CMC, 0,2 % de propilenglicol, 50 mM de NaCl, 25 mM de Leu, pH 7,5	0,2 % de CMC, 0,2 % de PG	142
9 % de sacarosa, 11 mM de fosfato de potasio, 0,3 % de CMC, 0,3 % de propilenglicol, 50 mM de NaCl, 25 mM de Leu, pH 7,5	0,3 % de CMC, 0,3 % de PG	143
9 % de sacarosa, 11 mM de fosfato de potasio, 0,5 % de CMC, 0,5 % de propilenglicol, 50 mM de NaCl, 25 mM de Leu, pH 7,5	0,5 % de CMC, 0,5% de PG	20
9 % de sacarosa, 11 mM de fosfato de potasio, 0,8 % de CMC, 0,8 % de propilenglicol, 50 mM de NaCl, 25 mM de Leu, pH 7,5	0,8 % de CMC, 0,8% de PG	144
9 % de sacarosa, 11 mM de fosfato de potasio, 0,9 % de CMC, 0,9 % de propilenglicol, 50 mM de NaCl, 25 mM de Leu, pH 7,5	0,9 % de CMC, 0,9 % de PG	145
9 % de sacarosa, 11 mM de fosfato de potasio, 0,8 % de CMC, 0,5 % de propilenglicol, 50 mM de NaCl, 25 mM de Leu, pH 7,5	0,8 % de CMC, 0,5 % de PG	138
9 % de sacarosa, 11 mM de fosfato de potasio, 0,5 % de CMC, 0,8 % de propilenglicol, 50 mM de NaCl, 25 mM de Leu, pH 7,5	0,5 % de CMC, 0,8 % de PG	139
9 % de sacarosa, 11 mM de fosfato de potasio, 0,3 % de CMC, 0,5 % de propilenglicol, 50 mM de NaCl, 25 mM de Leu, pH 7,5	0,3 % de CMC, 0,5 % de PG	123

Tabla 14a. Efecto de la concentración de CMC y PG en estabilidad a 25 °C.

Formulación	Número de formulación	Pérdida de log de DENV1 1 semana 25 ºC	Pérdida de log de DENV2 1 semana 25 ºC	Pérdida de log de DENV3 1 semana 25 ºC	Pérdida de log de DENV4 1 semana 25 ºC
Sin CMC o PG	140	0,41	0,38	0,42	0,43
Solo CMC	141	0,47	0,40	0,52	0,31
0,2 % CMC, 0,2 % PG	142	0,23	0,20	0,27	0,10
0,3 % CMC, 0,3 % PG	143	0,27	0,18	0,15	0,04
0,5 % CMC, 0,5 % PG	20	0,18	0,16	0,23	0,04
0,8 % CMC, 0,8 % PG	144	0,22	0,17	0,09	0,22
0,9 % CMC, 0,9 % PG	145	0,16	0,12	0,03	0,16
0,8 % CMC, 0,5 % PG	138	0,15	0,07	0,21	-0.01
0,5 % CMC, 0,8 % PG	139	0,20	0,12	0,18	0,04
0,3 % CMC, 0,5 % PG	123	0,22	0,13	0,10	0,08

Tabla 14b. Efecto de la concentración de CMC y PG en estabilidad a 25 °C.

Formulación	Número de formulación	Pérdida de log de DENV1 1 semana 25 ºC	Pérdida de log de DENV2 1 semana 25 ºC	Pérdida de log de DENV3 1 semana 25 ºC	Pérdida de log de DENV4 1 semana 25 ºC
0,5 % CMC, 0,5 PG	20	0,19	0,30	0,15	0,06
0,2 % CMC, 0,5 PG	122	0,20	0,15	0,21	0,07
0,3 % CMC, 0,5 PG	123	0,26	0,12	0,16	0,02
0,4 % CMC, 0,5 PG	124	0,26	0,33	0,33	0,10
0,1 % CMC, 0,5 PG	125	0,27	0,33	0,22	0,16
0,5 % CMC, 0,2 PG	126	0,23	0,20	0,30	0,11
0,5 % CMC, 0,3 PG	127	0,31	0,28	0,22	0,14
0,5 % CMC, 0,7 PG	128	0,24	0,20	0,15	0,14
0,5 % CMC, 0,1 PG	129	0,23	0,15	0,16	0,19

Todas las publicaciones que se mencionan en la presente se incorporan por referencia con el fin de describir y divulgar metodologías y materiales que se pueden usar en relación con la presente invención.

Luego de describir diferentes formas de realización de la invención en la presente con referencia a los dibujos adjuntos, cabe destacar que la invención no se limita a esas formas de realización específicas, y que una persona del oficio de nivel medio puede realizar diversos cambios y modificaciones en ellas sin apartarse del alcance o espíritu de la invención como se define en las reivindicaciones adjuntas.