

FORMULACIÓN DE VACUNA CONTRA EL DENGUE

CAMPO DE LA INVENCION

5 La presente invención está relacionada con una formulación de vacuna contra el dengue, dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue, usos de la formulación de vacuna contra el dengue en viales, kits y en métodos de prevención de la enfermedad del dengue, métodos para preparar una formulación de vacuna contra el dengue y métodos de administración.

10 ANTECEDENTES DE LA INVENCION

La enfermedad del dengue es la enfermedad viral transmitida por mosquitos de más rápida propagación causada por una infección por el virus del dengue, con un estimado de 390 millones de casos y 500 000 hospitalizaciones por año en todo el mundo. Con opciones limitadas de prevención,

15 se estima que los virus del dengue causan alrededor de 20 000 muertes cada año en todo el mundo. Las infecciones por el virus del dengue pueden provocar síntomas debilitantes y dolorosos, que incluyen fiebre alta repentina, dolores de cabeza, dolores articulares y musculares, náuseas, vómitos y erupciones cutáneas. Hasta la fecha se han identificado cuatro serotipos del virus del dengue: dengue-1 (DENV-1), dengue-2 (DENV-2), dengue-3 (DENV-3) y dengue-4 (DENV-4). Los

20 serotipos 1-4 del virus del dengue también pueden causar fiebre hemorrágica del dengue (DHF, por su sigla en inglés) y síndrome de choque por dengue (DSS, por su sigla en inglés). En los casos más graves, la DHF y el DSS pueden poner en peligro la vida. Los cuatro serotipos del virus del dengue son endémicos en todas las regiones tropicales del mundo y constituyen la amenaza viral transmitida por mosquitos más importante para los humanos en esas regiones. Los virus del dengue

25 son transmitidos a los seres humanos principalmente por los mosquitos *Aedes aegypti*, pero también por los mosquitos *Aedes albopictus*. La infección por un serotipo del virus del dengue produce protección de por vida contra la reinfección por ese serotipo, pero no previene la infección secundaria por uno de los otros tres serotipos del virus del dengue. De hecho, una infección previa con un serotipo del virus del dengue puede provocar un mayor riesgo de enfermedad grave (DHF/DSS) tras

30 una infección secundaria con un serotipo diferente.

Las vacunas para la protección contra infecciones virales se han utilizado con eficacia para reducir la incidencia de las enfermedades humanas. Una de las tecnologías más exitosas para las vacunas virales es inmunizar a los animales o seres humanos con una cepa de virus debilitada o atenuada (un «virus vivo atenuado»). Debido a la replicación limitada después de la inmunización, la cepa de

35 virus atenuada no causa enfermedad. Sin embargo, la replicación viral limitada es suficiente para

expresar el repertorio completo de antígenos virales y puede generar respuestas inmunitarias potentes y duraderas al virus. Por lo tanto, tras la exposición posterior a una cepa de virus de carácter patogénico, el individuo inmunizado queda protegido contra la enfermedad. Estas vacunas de virus vivos atenuados se encuentran entre las vacunas más exitosas utilizadas en salud pública.

- 5 Para que las vacunas de virus vivos atenuados sean eficaces, deben ser capaces de replicarse después de la inmunización, y los propios virus deben protegerse contra la degradación durante la preparación y el transporte antes de la administración a un sujeto, para garantizar, por ejemplo, que se suministre al sujeto la concentración de dosificación correcta. Algunas vacunas son sensibles a temperaturas extremas; el calor excesivo o la congelación accidental pueden inactivar la vacuna.
- 10 Mantener esta «cadena de frío» en toda la distribución es particularmente difícil en el mundo en desarrollo. Por lo tanto, sigue existiendo la necesidad de mejorar la estabilidad de los virus vivos atenuados en las formulaciones de vacunas, por ejemplo, en las formulaciones de vacunas contra el dengue, para mejorar la fabricación de vacunas, así como el transporte y suministro de las formulaciones.
- 15 En WO 2020/051334 A1 se describen formulaciones de vacuna contra el dengue estables. La principal motivación para el desarrollo de una nueva composición de excipientes es mejorar aún más la estabilidad del virus, lo que también se espera que reduzca la cantidad de virus necesaria para garantizar la potencia requerida al final de la vida útil (ESL) para la formulación de la vacuna.

20 **OBJETOS Y COMPENDIO**

Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue mejorada para reducir la degradación del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., los serotipos 1 a 4) durante la fabricación, el almacenamiento y el transporte de la formulación de vacuna contra el dengue.

25 Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue mejorada para reducir el consumo del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., los serotipos 1 a 4) durante la fabricación de una formulación de vacuna contra el dengue.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue mejorada para reducir la degradación del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., serotipos 1 a 4) durante la liofilización.

30 Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue mejorada para reducir el tiempo de secado.

35 Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue mejorada para reducir la degradación del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., serotipos 1 a 4)

después de la liofilización.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue mejorada para mejorar la compatibilidad fisiológica local de la formulación de vacuna contra el dengue después de la reconstitución.

5 Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue mejorada que mantenga características de baja formación de espuma tras la reconstitución de la formulación.

Un objeto de la presente invención es proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada que conserve su capacidad de inmunización potencial durante la preparación y durante el
10 período de tiempo farmacéuticamente aceptable requerido y que pueda disolverse en diluyente con una formación de espuma mínima.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar un método mejorado de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue para reducir el consumo de virus del dengue vivo atenuado.

15 Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método mejorado de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue para reducir la duración del ciclo de liofilización.

Otro objeto de la presente invención es proporcionar un método mejorado de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue para mejorar la capacidad del producto.

Un objeto adicional de la presente invención es proporcionar una vacuna segura y eficaz contra
20 todos los serotipos del virus del dengue para poblaciones con y sin dengue endémico y para una amplia variedad de edades y con independencia de la exposición previa al virus del dengue y el estado seropositivo o seronegativo correspondiente antes de la vacunación.

Por lo tanto, la presente invención está dirigida en parte a una formulación de vacuna contra el dengue que comprende:

25 una composición de virus del dengue tetravalente que comprende un serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado, un serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado, un serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado y un serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., «TAK-003»);

al menos un disacárido no reductor (p. ej., trehalosa y/o sacarosa);

al menos un poloxámero (p. ej., el poloxámero 407);

30 urea;

al menos un aminoácido con una cadena lateral de carga positiva con un pH neutro (p. ej., arginina, lisina y/o histidina);

trometamina; y

seroalbúmina humana.

35 La presente invención está dirigida en particular a una formulación de vacuna contra el dengue que

comprende:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:

(i) un serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., una cepa de serotipo 2/1 del dengue de carácter quimérico),

(ii) un serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., una cepa de serotipo 2 del dengue),

(iii) un virus del dengue vivo atenuado de serotipo 3 (p. ej., una cepa quimérica de serotipo 2/3 del dengue), y

(iv) un virus del dengue vivo atenuado de serotipo 4 (p. ej., una cepa quimérica de serotipo 2/4 del dengue); y

B. una composición de excipientes que comprende:

a. trehalosa,

b. poloxámero,

c. urea,

d. clorhidrato de arginina,

e. trometamina, y

f. seroalbúmina humana.

Se descubrió que, en particular, la combinación de trehalosa, poloxámero, urea, arginina, trometamina y seroalbúmina humana proporciona una estabilidad superior de la composición del virus del dengue tetravalente (p. ej., «TAK-003»). En particular, la composición de excipientes descrita en el presente documento ayuda a mejorar la estabilidad de la formulación de vacuna contra el dengue después del secado, por ejemplo, durante el almacenamiento y transporte de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada tal como se describe en el presente documento. La composición de excipientes tal como se describe en el presente documento también ayuda a mejorar la estabilidad de la formulación de vacuna contra el dengue durante la fabricación, por ejemplo, durante la congelación cuando la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento se somete a un proceso de liofilización. En determinadas modalidades de ese tipo, la composición de excipientes ayuda a evitar cambios de pH de la formulación de vacuna contra el dengue durante la congelación y, por lo tanto, reduce la degradación del virus del dengue vivo atenuado. En determinadas modalidades, la composición de excipientes ayuda a reducir el tiempo para liofilizar la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento. En determinadas modalidades, la composición de excipientes tal como se describe en el presente documento ayuda a mantener las características de baja formación de espuma de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento durante la reconstitución y la retirada.

La presente invención está dirigida en particular a una formulación de vacuna contra el dengue de

ese tipo que comprende:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:

(i) un serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., una cepa de serotipo 2/1 del dengue de carácter quimérico),

5 (ii) un serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., una cepa de serotipo 2 del dengue),

(iii) un virus del dengue vivo atenuado de serotipo 3 (p. ej., una cepa quimérica de serotipo 2/3 del dengue), y

(iv) un virus del dengue vivo atenuado de serotipo 4 (p. ej., una cepa quimérica de serotipo 2/4 del dengue); y

10 B. una composición de excipientes que comprende, en función del peso seco de la formulación de vacuna:

a. alrededor de 65 a 95 % p/p de trehalosa, tal como alrededor de 87.0 % p/p de trehalosa,

b. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de poloxámero, tal como alrededor de 2.9 % p/p de poloxámero,

c. alrededor de 0.1 a 6.0 % p/p de urea, tal como alrededor de 2.9 % p/p de urea,

15 d. alrededor de 0.1 a 5.0 % p/p de clorhidrato de arginina, tal como alrededor de 2.4 % p/p de clorhidrato de arginina,

e. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de trometamina, tal como alrededor de 1.2 % p/p de trometamina, y

20 f. alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p de seroalbúmina humana, tal como alrededor de 0.96 % p/p de seroalbúmina humana.

La presente invención está dirigida en particular a una formulación de vacuna contra el dengue de ese tipo que comprende:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:

(i) un serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., una cepa de serotipo 2/1 del dengue de carácter quimérico),

25 (ii) un serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., una cepa de serotipo 2 del dengue),

(iii) un virus del dengue vivo atenuado de serotipo 3 (p. ej., una cepa quimérica de serotipo 2/3 del dengue), y

(iv) un virus del dengue vivo atenuado de serotipo 4 (p. ej., una cepa quimérica de serotipo 2/4 del dengue); y

30 B. una composición de excipientes que comprende:

a. trehalosa,

b. poloxámero,

c. urea,

35 d. clorhidrato de arginina,

- e. trometamina, y
- f. seroalbúmina humana;

donde la relación de la cantidad de clorhidrato de arginina con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 4:1;

donde las sales de cloruro están contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 4.0 % p/p en función del peso seco de la formulación de vacuna;

donde las sales de fosfato están contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 1.0 % p/p en función del peso seco de la formulación de vacuna.

La presente invención está dirigida en particular a una formulación de vacuna contra el dengue de ese tipo que comprende:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:

- (i) el serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado,
- (ii) el serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado,
- (iii) el serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, y
- (iv) el serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado; y

B. una composición de excipientes que comprende:

- a. trehalosa,
- b. poloxámero,
- c. urea,
- d. clorhidrato de arginina,
- e. trometamina, y
- f. seroalbúmina humana;

donde el serotipo 1 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/1 de dengue, el serotipo 2 de dengue es una cepa no quimérica de serotipo 2 de dengue, el serotipo 3 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/3 de dengue y el serotipo 4 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/4 de dengue;

donde la cepa de serotipo 2 de dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 PDK-53 vivo atenuado y las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 de dengue al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 de dengue con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos del dengue, lo que da como resultado las cuatro cepas de virus de dengue vivo atenuado TDV-1, TDV-2, TDV-3 y TDV-4 (p. ej., «TAK-003»).

La presente invención está dirigida en particular a una formulación de vacuna contra el dengue de ese tipo que comprende:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:

- (i) TDV-1,
- (ii) TDV-2,
- (iii) TDV-3, y
- (iv) TDV-4; y

- 5 B. una composición de excipientes que comprende:
- a. trehalosa,
 - b. poloxámero,
 - c. urea,
 - d. clorhidrato de arginina,
 - 10 e. trometamina, y
 - f. seroalbúmina humana.

La presente invención está dirigida en particular a una formulación de vacuna contra el dengue de ese tipo que comprende:

- 15 A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:
- (i) el serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado,
 - (ii) el serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado,
 - (iii) el serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, y
 - (iv) el serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado; y
- 20 B. una composición de excipientes que comprende:
- a. trehalosa,
 - b. poloxámero,
 - c. urea,
 - d. clorhidrato de arginina,
 - e. trometamina, y
 - 25 f. seroalbúmina humana;

donde el serotipo 1 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/1 de dengue, el serotipo 2 de dengue es una cepa no quimérica de serotipo 2 de dengue, el serotipo 3 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/3 de dengue y el serotipo 4 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/4 de dengue;

- 30 donde la cepa de serotipo 2 del dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 16681 en estado natural y difiere en al menos tres nucleótidos con respecto a la versión en estado natural tal como se detallará a continuación:

- a) región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57)
- b) NS1-53 Gly a Asp (nt-2579)
- 35 c) NS3-250 Glu a Val (nt-5270);

donde las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos de dengue, lo que da como resultado las siguientes cepas quiméricas de dengue:

- 5
- una quimera de DENV-2/1,
 - una quimera de DENV-2/3, y
 - una quimera de DENV-2/4.

La presente invención está dirigida en particular a una formulación de vacuna contra el dengue de ese tipo que comprende:

- 10 A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende cuatro serotipos de virus del dengue vivo atenuado:

- (i) una cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico,
- (ii) una cepa de serotipo 2 de dengue,
- (iii) una cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico, y
- 15 (iv) una cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico;

donde la cepa de serotipo 2 del dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 16681 en estado natural y difiere en al menos tres nucleótidos con respecto a la versión en estado natural tal como se detallará a continuación:

- 20
- a) región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57)
 - b) NS1-53 Gly a Asp (nt-2579)
 - c) NS3-250 Glu a Val (nt-5270);

donde las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos de dengue, lo que da como resultado las siguientes cepas quiméricas de dengue:

- 25
- una quimera de DENV-2/1,
 - una quimera de DENV-2/3, y
 - una quimera de DENV-2/4;

y

- 30 B. una composición de excipientes que comprende:
- a. trehalosa,
 - b. poloxámero,
 - c. urea,
 - d. clorhidrato de arginina,
 - 35 e. trometamina, y

f. seroalbúmina humana;

donde la seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 1.0 % p/p en función del peso seco de la formulación de vacuna, donde la relación de la cantidad de clorhidrato de arginina con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 4:1.

La presente invención está dirigida en particular a una formulación de vacuna contra el dengue de ese tipo (p. ej., una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada) que comprende:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:

- (i) el serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado,
- (ii) el serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado,
- (iii) el serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, y
- (iv) el serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado; y

B. una composición de excipientes que comprende, en función del peso seco de la formulación de vacuna:

- a. alrededor de 65 a 95 % p/p de trehalosa,
- b. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de poloxámero,
- c. alrededor de 0.1 a 6.0 % p/p de urea,
- d. alrededor de 0.1 a 5.0 % p/p de clorhidrato de arginina,
- e. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de trometamina,
- f. alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p de seroalbúmina humana
- g. alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p de sales de cloruro, y
- h. alrededor de 0.05 a 0.5 % p/p de sales de fosfato;

donde el serotipo 1 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/1 de dengue, el serotipo 2 de dengue es una cepa no quimérica de serotipo 2 de dengue, el serotipo 3 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/3 de dengue y el serotipo 4 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/4 de dengue;

donde la cepa de serotipo 2 del dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 16681 en estado natural y difiere en al menos tres nucleótidos con respecto a la versión en estado natural tal como se detallará a continuación:

- a) región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57)
- b) NS1-53 Gly a Asp (nt-2579)
- c) NS3-250 Glu a Val (nt-5270);

donde las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 con las proteínas estructurales

correspondientes de los otros serotipos de dengue, lo que da como resultado las siguientes cepas quiméricas de dengue:

- una quimera de DENV-2/1,
- una quimera de DENV-2/3, y
- una quimera de DENV-2/4.

La presente invención está dirigida en particular a una formulación de vacuna contra el dengue de ese tipo en forma seca (p. ej., una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada) que comprende:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende cuatro serotipos de virus del dengue vivo atenuado:

- (i) una cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico,
- (ii) una cepa de serotipo 2 de dengue,
- (iii) una cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico, y
- (iv) una cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico;

donde la cepa de serotipo 2 del dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 16681 en estado natural y difiere en al menos tres nucleótidos con respecto a la versión en estado natural tal como se detallará a continuación:

- a) región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57)
- b) NS1-53 Gly a Asp (nt-2579)
- c) NS3-250 Glu a Val (nt-5270);

donde las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos de dengue, lo que da como resultado las siguientes cepas quiméricas de dengue:

- una quimera de DENV-2/1,
- una quimera de DENV-2/3, y
- una quimera de DENV-2/4; y

B. una composición de excipientes que comprende:

- a. trehalosa,
- b. poloxámero,
- c. urea,
- d. clorhidrato de arginina,
- e. trometamina, y
- f. seroalbúmina humana;

donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue tras la reconstitución con

0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable comprende:

- (i) la cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos 3.3 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (ii) la cepa de serotipo 2 de dengue en una concentración de al menos 2.7 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (iii) la cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos 4.0 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (iv) la cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos 4.5 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- a. la trehalosa en una concentración de 40 a 80 g/L, tal como alrededor de 55 g/L,
- b. el poloxámero en una concentración de alrededor de 0.1 a 5.0 g/L, tal como alrededor de 1.65 g/L,
- c. la urea en una concentración de alrededor de 0.1 a 6.0 g/L, tal como alrededor de 1.65 g/L,
- d. el clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 0.5 a 5.0 g/L, tal como alrededor de 1.4 g/L,
- e. la trometamina en una concentración de alrededor de 0.1 a 1.5 g/L, tal como alrededor de 0.7 g/L, y
- f. la seroalbúmina humana en una concentración de 0.1 a menos de 1 g/L, tal como alrededor de 0.55 g/L.

La presente invención está dirigida en particular a una formulación de vacuna contra el dengue de ese tipo en forma seca (p. ej., una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada) que comprende:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende cuatro serotipos de virus del dengue vivos atenuados:

- (i) una cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico,
- (ii) una cepa de serotipo 2 de dengue,
- (iii) una cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico, y
- (iv) una cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico;

donde la cepa de serotipo 2 del dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 16681 en estado natural y difiere en al menos tres nucleótidos con respecto a la versión en estado natural tal como se detallará a continuación:

- a) región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57)
- b) NS1-53 Gly a Asp (nt-2579)
- c) NS3-250 Glu a Val (nt-5270);

donde las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 con las proteínas estructurales

correspondientes de los otros serotipos de dengue, lo que da como resultado las siguientes cepas quiméricas de dengue:

- una quimera de DENV-2/1,
 - una quimera de DENV-2/3, y
 - una quimera de DENV-2/4; y
- B. una composición de excipientes que comprende:
- a. trehalosa,
 - b. poloxámero,
 - c. urea,
 - d. clorhidrato de arginina,
 - e. trometamina, y
 - f. seroalbúmina humana;

donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL comprende:

- (i) la cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos $3.3 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
 - (ii) la cepa de serotipo 2 de dengue en una concentración de al menos $2.7 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, o al menos $3.1 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
 - (iii) la cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos $4.0 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
 - (iv) la cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos $4.5 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- a. la trehalosa en una concentración de 40 a 80 g/L, tal como alrededor de 43 g/L (correspondiente a alrededor de 47 g/L de dihidrato de trehalosa),
 - b. el poloxámero en una concentración de alrededor de 0.1 a 5.0 g/L, tal como alrededor de 1.42 g/L,
 - c. la urea en una concentración de alrededor de 0.1 a 6.0 g/L, tal como alrededor de 1.42 g/L,
 - d. el clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 0.5 a 5.0 g/L, tal como alrededor de 1.18 g/L,
 - e. la trometamina en una concentración de alrededor de 0.1 a 1.5 g/L, tal como alrededor de 0.6 g/L, y
 - f. la seroalbúmina humana en una concentración de 0.1 a menos de 1 g/L, tal como alrededor de 0.48 g/L.

La presente invención está dirigida además en parte a un recipiente, tal como un vial, que comprende la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento,

preferiblemente en forma seca, tal como en forma liofilizada.

La presente invención está dirigida en particular a un recipiente de ese tipo, tal como un vial, que comprende de una a diez dosis unitarias, tal como una dosis unitaria o múltiples (p. ej., cinco) dosis unitarias, de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento. preferiblemente en forma seca, tal como en forma liofilizada.

La presente invención está dirigida en particular a un recipiente de ese tipo, tal como un vial, que comprende la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento, preferiblemente en forma seca, tal como en forma liofilizada, donde

a. la trehalosa está contenida en una cantidad de alrededor de 100 a 170 mg, tal como alrededor de 149 mg,

b. el poloxámero está contenido en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg, tal como alrededor de 4.95 mg,

c. la urea está contenida en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg, tal como alrededor de 4.95 mg,

d. el clorhidrato de arginina está contenido en una cantidad de alrededor de 1.5 a 7.5 mg, tal como alrededor de 4.1 mg,

e. la trometamina está contenida en una cantidad de alrededor de 0.5 a 4.0 mg, tal como alrededor de 2.0 mg,

f. la seroalbúmina humana está contenida en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.5 mg, tal como alrededor de 1.65 mg.

La presente invención está dirigida en particular a un recipiente de ese tipo, tal como un vial, que comprende cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento, donde

a. la trehalosa está contenida en una cantidad de alrededor de 100 a 170 mg, tal como alrededor de 149 mg,

b. el poloxámero está contenido en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg, tal como alrededor de 4.95 mg,

c. la urea está contenida en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg, tal como alrededor de 4.95 mg,

d. el clorhidrato de arginina está contenido en una cantidad de alrededor de 1.5 a 7.5 mg, tal como alrededor de 4.1 mg

e. la trometamina está contenida en una cantidad de alrededor de 0.5 a 4.0 mg, tal como alrededor de 2.0 mg,

f. la seroalbúmina humana está contenida en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.5 mg, tal como alrededor de 1.65 mg.

La presente invención está dirigida además en parte a un kit que comprende un recipiente o más de uno, por ejemplo, diez, tal como se describió en los párrafos anteriores, y opcionalmente un recipiente o más de uno, por ejemplo, diez, que comprenden un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable para la reconstitución.

5 La presente invención está dirigida además en parte a un kit para preparar una formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida que comprende: a) un recipiente, tal como un vial, que comprende la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca, tal como una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada, y b) un
10 recipiente, tal como un vial, que comprende un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable para la reconstitución.

La presente invención está dirigida en particular a un kit de ese tipo para preparar de una a diez dosis unitarias, tal como una dosis unitaria o múltiples (p. ej., cinco) dosis unitarias, de una formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida que comprende: a) un recipiente, tal como un vial, que comprende de una a diez dosis unitarias, tal como una dosis unitaria o múltiples
15 (p. ej., cinco) dosis unitarias, de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca, tal como una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada tal como se describe en el presente documento, y b) un recipiente, tal como un vial, que comprende de una a diez alícuotas, por ejemplo, una alícuota (p. ej., 0.5 mL/dosis unitaria) o múltiples (p. ej., cinco) alícuotas (p. ej., 2.5 mL), de un diluyente acuoso farmacéuticamente
20 aceptable (p. ej., solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM) para la reconstitución, donde la cantidad de alícuotas corresponde a la cantidad de dosis unitarias. Dicha/s alícuota/s se proporcionan preferiblemente en un recipiente, tal como en un vial.

La presente invención está dirigida además en parte a cinco dosis unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que se pueden obtener mediante la reconstitución de
25 cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca con cinco alícuotas de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable.

La presente invención está dirigida además en parte a una dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que se pueden obtener mediante la reconstitución de una
30 dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca con una alícuota (p. ej., 0.5 mL/dosis unitaria) de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM).

La presente invención está dirigida además en parte a una dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que se puede obtener mediante la reconstitución de
35 múltiples dosis unitarias, p. ej., cinco dosis unitarias, de la formulación de vacuna contra el dengue

tal como se describe en el presente documento en forma seca con múltiples alícuotas, p. ej., cinco alícuotas, de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM), donde la cantidad de alícuotas corresponde a la cantidad de dosis unitarias, y el retiro del volumen de una dosis unitaria (p. ej., 0.5 mL) de la formulación de vacuna contra el dengue reconstituida.

La presente invención está dirigida además en parte a un método de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa, (b) congelar la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa para formar una formulación de vacuna contra el dengue congelada, (c) someter la formulación de vacuna contra el dengue congelada a una etapa de secado primario en un aparato con una temperatura de almacenamiento, que se encuentre por encima de la temperatura de transición vítrea T_g de la formulación hasta no más de 25 °C por encima, o no más de 20 °C por encima de la temperatura de transición vítrea T_g y a una presión por debajo de 0.1 mbar para formar un producto secado primario, y (d) someter el producto secado primario producto a una etapa de secado secundario en un aparato con una temperatura de almacenamiento, que se encuentre por encima de la temperatura de almacenamiento de la etapa de secado primario y a una presión por debajo de 1 mbar para formar un producto secado secundario.

La presente invención está dirigida además en parte a un método de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa, (b) congelar la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa para formar una formulación de vacuna contra el dengue congelada, (c) someter la formulación de vacuna contra el dengue congelada a una etapa de secado primario en un aparato con una temperatura de almacenamiento, que se encuentre por encima de la temperatura de transición vítrea T_g de la formulación hasta no más de 15 °C por encima de la temperatura de transición vítrea T_g y a una presión por debajo de 0.1 mbar para formar un producto secado primario, y (d) someter el producto secado primario producto a una etapa de secado secundario en un aparato con una temperatura de almacenamiento, que se encuentre por encima de la temperatura de almacenamiento de la etapa de secado primario y a una presión por debajo de 1 mbar para formar un producto secado secundario.

La presente invención está dirigida además en parte a un método de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que comprenda:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprenda:

(i) el serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado, (ii) el serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado, (iii) el serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, y (iv) el serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado; y

B. una composición de excipientes que comprenda: a. trehalosa, b. poloxámero, c. urea, d. clorhidrato de arginina, e. trometamina, y f. seroalbúmina humana,

(b) congelar la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa en un aparato con una temperatura de almacenamiento por debajo de -35 °C para formar una formulación de vacuna contra el dengue congelada,

(c) someter la formulación de vacuna contra el dengue congelada a una etapa de secado primario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de -31 a -19 °C y a una presión por debajo de 0.1 mbar para formar un producto secado primario, y

(d) someter el producto secado primario a una etapa de secado secundario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de al menos 15 °C y a una presión por debajo de 1 mbar para formar un producto secado secundario.

La presente invención está dirigida además en parte a un método de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que comprenda:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprenda:

(i) el serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado, (ii) el serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado, (iii) el serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, y (iv) el serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado; y

B. una composición de excipientes que comprenda: a. trehalosa, b. poloxámero, c. urea, d. clorhidrato de arginina, e. trometamina, y f. seroalbúmina humana,

(b) congelar la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa en un aparato con una temperatura de almacenamiento por debajo de -35 °C para formar una formulación de vacuna contra el dengue congelada,

(c) someter la formulación de vacuna contra el dengue congelada a una etapa de secado primario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de -31 a -21 °C y a una presión por debajo de 0.1 mbar para formar un producto secado primario, y

(d) someter el producto secado primario a una etapa de secado secundario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de al menos 20 °C y a una presión por debajo de 1 mbar para formar un producto secado secundario.

Los parámetros beneficiosos del método de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tal como se describe en el presente documento ayudan a reducir el tiempo

de secado de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento y a mejorar la apariencia de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca. La presente invención está dirigida además en parte a un método de preparación de cinco dosis unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que comprenda:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:

(i) un serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2/1 del dengue de carácter quimérico,

(ii) un serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2 del dengue,

(iii) un serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2/3 del dengue de carácter quimérico, y

(iv) un serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2/4 del dengue de carácter quimérico; y

B. una composición de excipientes que comprende:

a. alrededor de 9 a 11 % p/v, tal como alrededor de 10 % p/v de trehalosa,

b. alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v, tal como alrededor de 0.3 % p/v de poloxámero,

c. alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v, tal como alrededor de 0.3 % p/v de urea,

d. alrededor de 0.2 a 0.3 % p/v, tal como alrededor de 0.25 % p/v de clorhidrato de arginina,

e. alrededor de 0.05 a 0.15 % p/v, tal como alrededor de 0.1 % p/v de trometamina, y

f. alrededor de 0.05 a 0.15 % p/v, tal como alrededor de 0.1 % p/v de seroalbúmina humana,

(b) congelar la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de -40 a -50 °C para formar una formulación de vacuna contra el dengue congelada,

(c) someter la formulación de vacuna contra el dengue congelada a una etapa de secado primario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de -31 a -19 °C, o de alrededor de -31 a -21 °C y a una presión por debajo de 0.1 mbar durante un período de alrededor de 30 a 100 horas para formar un producto secado primario, y

(d) someter el producto secado primario a una etapa de secado secundario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de 15 a 40 °C y a una presión por debajo de 1 mbar durante un período de alrededor de 3 a 10 horas para formar un producto secado secundario, donde la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa se somete a la etapa de congelación b) en un volumen que es alrededor de la mitad del volumen utilizado para reconstituir las cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca.

La presente invención está dirigida además en parte a un método de preparación de cinco dosis

unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que comprenda:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:

5 (i) un serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2/1 del dengue de carácter quimérico,

(ii) un serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2 del dengue,

(iii) un serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2/3 del dengue de carácter quimérico, y

10 (iv) un serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2/4 del dengue de carácter quimérico; y

B. una composición de excipientes que comprende:

a. alrededor de 9 a 11 % p/v, tal como alrededor de 10 % p/v de trehalosa,

b. alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v, tal como alrededor de 0.3 % p/v de poloxámero,

15 c. alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v, tal como alrededor de 0.3 % p/v de urea,

d. alrededor de 0.2 a 0.3 % p/v, tal como alrededor de 0.25 % p/v de clorhidrato de arginina,

e. alrededor de 0.05 a 0.15 % p/v, tal como alrededor de 0.1 % p/v de trometamina, y

f. alrededor de 0.05 a 0.15 % p/v, tal como alrededor de 0.1 % p/v de seroalbúmina humana,

20 (b) congelar la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de -40 a -50 °C para formar una formulación de vacuna contra el dengue congelada,

(c) someter la formulación de vacuna contra el dengue congelada a una etapa de secado primario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de -31 a -19 °C, o de alrededor de -31 a -21 °C y a una presión por debajo de 0.1 mbar durante un período de alrededor de 30 a 100 horas para formar un producto secado primario, y

25 (d) someter el producto secado primario a una etapa de secado secundario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de 20 a 40 °C y a una presión por debajo de 1 mbar durante un período de alrededor de 3 a 10 horas para formar un producto secado secundario, donde la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa se somete a la etapa de congelación b) en un volumen que es alrededor de la mitad del volumen utilizado para reconstituir las cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca.

30 La formulación de vacuna contra el dengue beneficiosa tal como se describe en el presente documento en combinación con el método beneficioso para su preparación en forma seca tal como se describe en el presente documento mediante el uso de un volumen de llenado reducido para
35 secar múltiples dosis unitarias (p. ej., cinco dosis unitarias) de la formulación de vacuna contra el

dengue ayuda a reducir el consumo de virus del dengue (p. ej., TDV-3), a reducir el tiempo de llenado y el tiempo en solución de la formulación de vacuna contra el dengue durante la fabricación, así como a reducir la duración del ciclo de liofilización, lo que deriva en un aumento de la capacidad del producto.

5 La presente invención está dirigida además en parte a una formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento para el uso en un método de prevención de la enfermedad del dengue en un sujeto, donde el método comprende administrar una vacunación primaria solamente con dos administraciones de una dosis unitaria que comprenden las siguientes etapas: administrar una primera dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto,

10 y administrar una segunda dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto, por ejemplo, en los 3 meses posteriores a la administración de la primera dosis unitaria, y opcionalmente administrar una dosis de refuerzo al menos 12 meses después de la administración de dicha segunda dosis unitaria de la vacuna contra el dengue.

15 La presente invención está dirigida además en parte a un método de prevención de la enfermedad del dengue en un sujeto que comprende administrar una vacunación primaria solamente con dos administraciones de una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento que comprenden las siguientes etapas: administrar una primera dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto, y administrar una segunda dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto en los 3 meses posteriores a

20 la administración de la primera dosis unitaria, y opcionalmente administrar una dosis de refuerzo al menos 12 meses después de la administración de dicha segunda dosis unitaria de la vacuna contra el dengue.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

25 En la Fig. 1 se ilustran datos obtenidos de experimentos con una formulación de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el Ejemplo 1 descrito en el presente documento y una formulación de control de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el ejemplo comparativo descrito en el presente documento («Control») para determinar la reducción en los valores (pérdida

30 logarítmica) de TDV-1 y TDV-2 después de la exposición de las formulaciones liofilizadas a alrededor de 5 °C durante 12 meses.

En la Fig. 2 se ilustran datos obtenidos de experimentos con una formulación de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el Ejemplo 1 descrito en el presente documento y una formulación de control de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el ejemplo comparativo descrito

35 en el presente documento («Control») para determinar la reducción en los valores (pérdida

logarítmica) de TDV-3 y TDV-4 después de la exposición de las formulaciones liofilizadas a alrededor de 5 °C durante 12 meses.

En la Fig. 3 se ilustra la estructura genética de las cuatro cepas de dengue contenidas en la TDV tal como se publicó en el documento WO 2020/051334 A1. Los triángulos indican las tres mutaciones de atenuación presentes en las proteínas 5'NCR, NS1 y NS3. Las cepas TDV-1, TDV-3 y TDV-4 son virus quiméricos en los que los genes prM y E del serotipo 1, 3 y 4 del dengue, respectivamente, se insertan en la estructura principal de TDV-2.

En la Fig. 4 se ilustran datos obtenidos de experimentos con una formulación de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el Ejemplo 3 descrito en el presente documento y una formulación de control de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el ejemplo comparativo descrito en el presente documento («Control») para determinar la reducción en los valores (pérdida logarítmica) de TDV-1 y TDV-2 después de la exposición de las formulaciones liofilizadas a alrededor de 5 °C durante 6, 9, 12, 18 y 24 meses.

En la Fig. 5 se ilustran datos obtenidos de experimentos con una formulación de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el Ejemplo 3 descrito en el presente documento y una formulación de control de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el ejemplo comparativo descrito en el presente documento («Control») para determinar la reducción en los valores (pérdida logarítmica) de TDV-3 y TDV-4 después de la exposición de las formulaciones liofilizadas a alrededor de 5 °C durante 6, 9, 12, 18 y 24 meses.

En la Fig. 6 se ilustran datos obtenidos de experimentos con una formulación de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el Ejemplo 4 descrito en el presente documento y una formulación comparativa contra el dengue 20 descrita en el presente documento para determinar los valores en el día 0 y en el día 30 después de la exposición de las formulaciones líquidas a 2 a 8 °C.

Todas las referencias y publicaciones citadas en el presente documento se incorporan en su totalidad mediante esta referencia a todos los efectos.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

Definiciones

Al describir la presente invención, se utilizarán los términos y las expresiones que siguen tal como se indicará a continuación. Tal como se usan en el presente documento, las formas singulares «un/una» y «el/la», incluyen las referencias al plural, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones «dosis», «dosis unitaria», «dosis

unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue» y «dosis unitaria de la invención tal como se describe en el presente documento» hacen referencia a la cantidad de una vacuna contra el dengue que se administra a un sujeto en una sola dosis. En una modalidad, una dosis unitaria está presente en un recipiente, tal como un vial, y esta dosis unitaria se administra a un sujeto, opcionalmente después de la reconstitución. En una modalidad, puede haber más de una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue presente en un vial de forma tal que con el contenido de un vial se pueda vacunar a más de un sujeto. En una modalidad específica, múltiples (por ejemplo, cinco) dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue están presentes en un vial. Si hay múltiples (por ejemplo, cinco) dosis unitarias presentes en un vial en forma seca, se puede obtener una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue mediante la reconstitución de las múltiples (por ejemplo, cinco) dosis unitarias con la misma cantidad de alícuotas (por ejemplo, cinco) de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable y el retiro del volumen de una dosis unitaria (p. ej., 0.5 mL) de la formulación de vacuna contra el dengue reconstituida.

Tal como se usa en el presente documento, el término «alícuota» hace referencia al volumen de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable por dosis unitaria, expresado en mL/dosis unitaria, al que se somete una dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca para la reconstitución. Por consiguiente, si una dosis unitaria está presente en un recipiente, tal como un vial, se añade una alícuota (p. ej., 0.5 mL/dosis unitaria) de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable para la reconstitución. Si hay múltiples (p. ej., cinco) dosis unitarias presentes en un recipiente, tal como un vial, se añade una cantidad igual de alícuotas (p. ej., cinco alícuotas) de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable para la reconstitución. En determinadas modalidades de ese tipo, las múltiples (p. ej., cinco) alícuotas para la reconstitución se proporcionan en un recipiente, tal como un vial o una jeringa, y el volumen de las múltiples (p. ej., cinco) alícuotas (p. ej., 2.5 mL) se añaden preferiblemente de una vez a la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca. El volumen de la formulación de vacuna reconstituida es mayor que la/s alícuota/s usada/s para reconstitución, ya que los componentes disueltos de la formulación de vacuna se añaden al volumen final.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión «un recipiente, tal como un vial, que comprende una o más de una dosis unitaria (p. ej., una dosis unitaria, de una a diez dosis unitarias, múltiples dosis unitarias o cinco dosis unitarias) de la formulación de vacuna contra el dengue» permite un sobrellenado de la formulación de vacuna contra el dengue en un factor de alrededor de 1.3 por dosis unitaria. Esto permite retirar con precisión una dosis unitaria del recipiente, tal como el vial. Por ejemplo, un recipiente, tal como un vial, que comprende una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca contiene 1.3 veces la cantidad de vacuna contra el dengue que se ha de administrar a un sujeto en una sola dosis. El volumen del diluyente acuoso

farmacéuticamente aceptable que se añade para la reconstitución aumenta de manera acorde en el mismo factor (p. ej., $1.3 \times 0.5 \text{ mL/dosis unitaria} = 0.65 \text{ mL}$). Luego se retira el volumen de una dosis unitaria (p. ej., 0.5 mL), por ejemplo con una jeringa, del volumen total de formulación de vacuna contra el dengue reconstituida y se administra a un sujeto. De manera alternativa, se retira el volumen total de la formulación de vacuna contra el dengue reconstituida (p. ej. 0.7 mL), por ejemplo, con una jeringa, y se administra a un sujeto el volumen de una dosis unitaria (p. ej. 0.5 mL). En una modalidad preferida, la formulación de vacuna contra el dengue en el vial se reconstituye con el contenido completo de un vial o jeringa precargada de diluyente (p. ej. solución de cloruro de sodio a 37 mM) de forma tal que pueda extraerse y administrarse una dosis de vacuna de 0.5 mL.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión «tras la reconstitución con 0.5 mL» no limita la reconstitución a su realización con 0.5 mL del diluyente, sino que hace referencia a la cantidad de virus y excipiente que estará presente en una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue cuando usan 0.5 mL de diluyente para la reconstitución. Si bien el uso de un volumen diferente para reconstituir una dosis unitaria (p. ej., 0.8 mL) dará como resultado una concentración diferente de virus en la dosis unitaria reconstituida, la administración del volumen total de la dosis unitaria (p. ej., 0.8 mL) dará como resultado la administración de la misma cantidad total de virus. Lo mismo aplica a la cantidad de excipiente contenida en una dosis unitaria reconstituida a menos que el diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable utilizado para la reconstitución contenga excipientes adicionales. Si el diluyente contiene excipientes adicionales (p. ej., cloruro de sodio), la cantidad total de excipientes contenidos en una dosis unitaria reconstituida aumentará en la cantidad de excipientes añadidos por el diluyente. En una modalidad preferida de la invención, el diluyente no añade excipientes además del cloruro de sodio a la dosis unitaria. En determinadas modalidades de ese tipo, el diluyente usado para la reconstitución añade menos de 1.5 mg/dosis unitaria (p. ej., alrededor de 1.1 mg/dosis unitaria) de cloruro de sodio a la formulación de vacuna contra el dengue.

Una «dosis unitaria reconstituida» o «dosis unitaria en forma reconstituida» se obtiene a partir de la dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca mediante reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable. El diluyente no contiene virus del dengue. La dosis unitaria reconstituida es un líquido que se puede administrar a un sujeto, por ejemplo, mediante inyección, tal como inyección subcutánea.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión «formulación de vacuna contra el dengue en forma seca» hace referencia a una formulación obtenida y/o que puede obtenerse al someter un volumen determinado de la formulación de vacuna líquida contra el dengue a un procedimiento de secado, tal como la liofilización, para retirar el disolvente. Una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada se obtiene y/o puede obtenerse al someter un volumen determinado de la formulación de vacuna contra el dengue líquida a liofilización, un procedimiento de secado en el que

primero se congela la formulación y luego se retira el hielo o disolvente congelado mediante sublimación al vacío. Tal como se usa en el presente documento, una formulación liofilizada es una formulación en forma seca. La formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tal como se describe en el presente documento tiene un contenido de humedad residual preferiblemente inferior al 5 % p/p.

Tal como se usa en el presente documento, «% p/p» o «% (p/p)» hace referencia al % mg/mg. El % p/p de un componente «en función del peso seco de la formulación de vacuna» tal como se usa en el presente documento puede calcularse al dividir la cantidad de dicho componente en mg por la cantidad de formulación de vacuna contra el dengue en forma seca en mg y multiplicar el resultado por 100. De manera alternativa, el % p/p de un componente «en función del peso seco de la formulación de vacuna» tal como se usa en el presente documento puede calcularse al dividir la cantidad de dicho componente en mg por la cantidad total de excipientes contenidos en la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca en mg y multiplicar el resultado por 100, ya que el peso de la composición de virus del dengue tetravalente contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca es insignificante, y la diferencia en el resultado es insignificante.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión «alrededor de» usada para intervalos numéricos hace referencia a una variación de ± 10 %.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión «formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa» hace referencia a una formulación líquida a base de agua. Una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa puede someterse a un procedimiento de secado, tal como la liofilización, para obtener una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca. También se puede formar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa a partir de una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca mediante reconstitución con un diluyente farmacéuticamente aceptable. Por lo tanto, las expresiones «formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida» y «formulación de vacuna contra el dengue reconstituida» hacen referencia a una formulación obtenida a partir de una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca, tal como una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada, mediante reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, tal como solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM o agua para inyección. El diluyente no contiene virus del dengue. La formulación de vacuna contra el dengue reconstituida puede administrarse a un sujeto, por ejemplo, mediante inyección, tal como inyección subcutánea.

Tal como se usa en el presente documento, «% p/v» o «% (p/v)» hace referencia al % mg/mL donde, p. ej., 100 mg/mL constituye 10 % p/v.

Tal como se usa en el presente documento, una «concentración de al menos X log₁₀ ufp/0.5 mL»

hace referencia a la concentración de un serotipo de dengue en 0.5 mL, pero no limita la dosis unitaria a 0.5 mL. Si la dosis unitaria tiene un volumen diferente de 0.5 mL, o está liofilizada a partir de un volumen diferente de 0.5 mL, o se reconstituye con un volumen diferente de 0.5 mL, dicha concentración diferirá de la «concentración de al menos $X \log_{10}$ ufp/0.5 mL». Sin embargo, si la dosis unitaria tiene un volumen de 0.5 mL, o se liofiliza a partir de un volumen de 0.5 mL, o se reconstituye con un volumen de 0.5 mL, dicha concentración será la «concentración de al menos $X \log_{10}$ ufp/0.5 mL». Por lo tanto, aunque la concentración puede diferir, la cantidad total de virus en la dosis unitaria sigue siendo la misma.

La «concentración total en ufp/0.5 mL» que sirve como valor de base para el cálculo de la concentración porcentual para cada componente individual de una vacuna contra el dengue tetravalente se muestra para un ejemplo de composición de vacuna tetravalente que comprende el serotipo 1 del dengue en una concentración de 3.60 $\log_{10}$ ufp/0.5 mL, una concentración del serotipo 2 del dengue de 4.00 $\log_{10}$ ufp/0.5 mL, una concentración del serotipo 3 del dengue de 4.60 $\log_{10}$ ufp/0.5 mL y una concentración del serotipo 4 del dengue de 5.11 $\log_{10}$ ufp/0.5 mL. En primer lugar, los valores logarítmicos de las concentraciones se convierten en valores numéricos. Los resultados de esta conversión son 4×10^3 ufp/0.5 mL para el serotipo 1, 1×10^4 ufp/0.5 mL para el serotipo 2, 4×10^4 ufp/0.5 mL para el serotipo 3 y 1.3×10^5 ufp/0.5 mL para el serotipo 4. La concentración total en ufp/0.5 mL es la suma de los valores numéricos anteriores que da como resultado 1.84×10^5 ufp/0.5 mL.

La «concentración porcentual» para cada uno de los serotipos 1, 2, 3 y 4 se obtiene al dividir el valor de concentración numérico (expresado en ufp/0.5 mL) de un serotipo individual por la concentración total (expresada en ufp/0.5 mL) y multiplicar el resultado por 100, es decir:

Concentración porcentual de serotipo 1 = $(4 \times 10^3 \text{ ufp/0.5 mL} \div 1.84 \times 10^5 \text{ ufp/0.5 mL}) \times 100 = 2 \%$.

Concentración porcentual de serotipo 2 = $(1 \times 10^4 \text{ ufp/0.5 mL} \div 1.84 \times 10^5 \text{ ufp/0.5 mL}) \times 100 = 5 \%$.

Concentración porcentual de serotipo 3 = $(4 \times 10^4 \text{ ufp/0.5 mL} \div 1.84 \times 10^5 \text{ ufp/0.5 mL}) \times 100 = 22 \%$.

Concentración porcentual de serotipo 4 = $(1.3 \times 10^5 \text{ ufp/0.5 mL} \div 1.84 \times 10^5 \text{ ufp/0.5 mL}) \times 100 = 71 \%$.

Las concentraciones porcentuales se redondean a números enteros.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones «serotipo del dengue» y «serotipo del virus del dengue» hacen referencia a una especie de virus del dengue que se define por sus antígenos de la superficie celular y, por lo tanto, puede distinguirse mediante métodos serológicos conocidos en la técnica. En la actualidad, se conocen cuatro serotipos del virus del dengue, es decir, el serotipo 1 del dengue (DENV-1), el serotipo 2 del dengue (DENV-2), el serotipo 3 del dengue (DENV-3) y el serotipo 4 del dengue (DENV-4).

Tal como se usa en el presente documento, la expresión «composición del virus del dengue tetravalente» hace referencia a una composición del virus del dengue que comprende cuatro

componentes inmunogénicos diferentes de los cuatro serotipos de dengue diferentes DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, que comprenden preferiblemente cuatro virus de dengue vivos atenuados diferentes, cada uno de los cuales representa un serotipo de dengue, y que tiene como objetivo estimular las respuestas inmunitarias a los cuatro serotipos de dengue.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión «virus del dengue vivo atenuado» hace referencia a un virus del dengue viable que está mutado para proporcionar una virulencia reducida. El virus del dengue vivo atenuado puede ser un virus del dengue en el que todos los componentes deriven del mismo serotipo del dengue o puede ser un virus del dengue quimérico que tenga partes de dos o más serotipos del dengue.

10 Una «cepa de virus» y, en particular, una «cepa de virus del dengue» es un subtipo genético de un virus, en particular de un virus del dengue, que se caracteriza por una secuencia específica de ácido nucleico. Un serotipo de dengue puede comprender diferentes cepas con diferentes secuencias de ácido nucleico que tengan los mismos antígenos de la superficie celular. Una cepa de virus del dengue puede ser un virus del dengue en el que todos los componentes deriven del mismo serotipo
15 del dengue o puede ser un virus del dengue quimérico que tenga partes de dos o más serotipos del dengue.

Tal como se usa en el presente documento, «TDV-2» hace referencia a una cepa de serotipo 2 del dengue clonada y caracterizada molecularmente derivada de la cepa de virus DEN-2 PDK-53 vivo atenuado. La cepa PDK-53 se describe, por ejemplo, en Bhamarapravati et al. (1987) Boletín de la
20 Organización Mundial de la Salud 65(2): 189-195. En una modalidad, la cepa TDV-2 sirvió como estructura principal para las cepas TDV-1, TDV-3 y TDV-4 quiméricas en las que se introdujeron partes de las cepas TDV-1, TDV-3 y TDV-4. TDV-1, TDV-2, TDV-3 y TDV-4 forman en su conjunto una composición de virus del dengue tetravalente, «TAK-003», una vacuna candidata contra el dengue para la cual Takeda ha presentado recientemente solicitudes regulatorias.

25 Un «virus del dengue no quimérico» o una «cepa de serotipo de dengue de carácter no quimérico» o una «cepa de dengue no quimérico» comprende solamente partes de un serotipo de dengue. En particular, un virus del dengue no quimérico no incluye partes de un flavivirus diferente tal como el virus de la fiebre amarilla, el virus del Zika, el virus del Nilo Occidental, el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la encefalitis de San Luis o el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas.

30 TDV-2 es un ejemplo de virus del dengue no quimérico.

Un «virus del dengue quimérico» o una «cepa de serotipo de dengue de carácter quimérico» o una «cepa de dengue quimérica» comprende partes de al menos dos serotipos de dengue diferentes. Preferiblemente, el virus del dengue quimérico no incluye partes de un flavivirus diferente tal como el virus de la fiebre amarilla, el virus del Zika, el virus del Nilo Occidental, el virus de la encefalitis
35 japonesa, el virus de la encefalitis de San Luis o el virus de la encefalitis transmitida por garrapatas.

Más preferiblemente, el virus del dengue quimérico descrito en el presente documento no incluye partes del virus de la fiebre amarilla. Tal como se usan en el presente documento, una «cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico» o una «quimera de DENV-2/1» o «TDV-1» hacen referencia a una construcción quimérica de virus del dengue que comprende partes de DENV-2 y de DENV-1. Preferiblemente, en la cepa de serotipo 2/1 del dengue de carácter quimérico, las proteínas prM y E de DENV-1 reemplazan a las proteínas prM y E de DENV-2 tal como se detallará más adelante. Tal como se usan en el presente documento, una «cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico» o una «quimera de DENV-2/3» o «TDV-3» hacen referencia a una construcción quimérica de virus del dengue que comprende partes de DENV-2 y de DENV-3. Preferiblemente, en la cepa de serotipo 2/3 del dengue de carácter quimérico, las proteínas prM y E de DENV-3 reemplazan a las proteínas prM y E de DENV-2 tal como se detallará más adelante. Tal como se usan en el presente documento, una «cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico» o una «quimera de DENV-2/4» o «TDV-4» hacen referencia a una construcción quimérica de virus del dengue que comprende partes de DENV-2 y de DENV-4. Preferiblemente, en la cepa de serotipo 2/4 del dengue de carácter quimérico, las proteínas prM y E de DENV-4 reemplazan a las proteínas prM y E de DENV-2 tal como se detallará más adelante.

Tal como se usa en el presente documento, «TDV» hace referencia a una vacuna contra el dengue viva atenuada tetravalente que comprende una mezcla de las cuatro cepas de virus del dengue vivo atenuado TDV-1, TDV-2, TDV-3 y TDV-4 que expresan antígenos de la superficie de los cuatro serotipos del dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, respectivamente. En una modalidad (p. ej., también en los ejemplos), TDV-1 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 1 y/o la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 2. En una modalidad, TDV-2 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 3 y/o la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 4. En una modalidad, TDV-3 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 5 y/o la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 6. En una modalidad, TDV-4 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 7 y/o la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 8.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión «pérdida por liofilización» hace referencia a la pérdida log₁₀ en el valor del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., TDV-3) a causa de la liofilización y se calcula al restar la cantidad de virus del dengue vivo atenuado en log₁₀ ufp/dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada de la cantidad de virus del dengue vivo atenuado en log₁₀ ufp/dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma líquida antes de la liofilización. Para el análisis, la formulación de la vacuna contra el dengue en forma líquida se congela y se almacena a -80 °C y se descongela antes de la evaluación. La formulación de vacuna contra el dengue liofilizada se reconstituye antes de la evaluación.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión «pérdida de estabilidad» hace referencia a la pérdida log10 en el valor del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., TDV-3) a causa del almacenamiento a una temperatura especificada (p. ej., 2-8 °C) y se calcula al restar la cantidad de virus del dengue vivo atenuado en log10 ufp/dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada, que se almacenó a una temperatura especificada, tal como 2-8 °C, durante un período especificado, tal como 3 meses, 6 meses, 8 meses o 12 meses, de la cantidad de virus del dengue vivo atenuado en log10 ufp/dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada antes del almacenamiento. Las formulaciones de vacunas contra el dengue liofilizadas se reconstituyen antes de la evaluación.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión «pérdida de estabilidad acelerada» hace referencia a la pérdida log10 en el valor del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., TDV-3) a causa del almacenamiento en condiciones aceleradas y se calcula al restar la cantidad de virus del dengue vivo atenuado en log10 ufp/dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada, que se almacenó a 25 °C durante un período especificado, tal como 2 semanas, 5 semanas o 12 semanas, de la cantidad de virus del dengue vivo atenuado en log10 ufp/dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada antes del almacenamiento. Las formulaciones de vacuna contra el dengue liofilizadas se reconstituyen antes de la evaluación.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión «condiciones aceleradas» hace referencia a una temperatura de 25 °C y una humedad relativa HR del 65 % o una temperatura de 25 °C y una humedad relativa HR de alrededor de 60 % en la cámara de estabilidad. Se pueden utilizar condiciones aceleradas para cribar y seleccionar formulaciones superiores de vacunas contra el dengue.

Tal como se usa en el presente documento, el término «Tg» hace referencia a la temperatura de transición vítrea determinada mediante calorimetría diferencial de barrido, tal como calorimetría diferencial de barrido a baja temperatura (LT-DSC, por su sigla en inglés). El análisis de LT-DSC puede realizarse mediante el método descrito en USP <891> de la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión «enfermedad del dengue» hace referencia a la enfermedad que es causada por la infección con el virus del dengue. Los síntomas de la enfermedad del dengue pueden incluir, p. ej., fiebre alta repentina, dolores de cabeza, dolores articulares y musculares, náuseas, vómitos y erupciones cutáneas. La expresión «enfermedad del dengue» también incluye las formas más graves de fiebre hemorrágica del dengue (DHF) y síndrome de choque del dengue (DSS). Los síntomas de la DHF incluyen el aumento de la permeabilidad vascular, la hipovolemia y los mecanismos anormales de coagulación sanguínea. Los sujetos con DHF pueden presentar manifestaciones graves de pérdida de plasma y hemorragia. Cuando un

sujeto con DHF experimenta un choque, se lo clasifica como paciente con DSS. Los síntomas del DSS incluyen el sangrado, que puede aparecer como pequeñas manchas de sangre en la piel y manchas de sangre más grandes debajo de la piel. El choque prolongado es el principal factor asociado a complicaciones que incluyen una hemorragia gastrointestinal masiva que puede provocar la muerte. Tal como se usa en el presente documento, los casos de DHF se definen como casos de VCD que cumplen con los criterios para la DHF de la OMS de 1997. En el contexto de la prevención de la enfermedad del dengue en sujetos de edad avanzada, la expresión «prevención de la enfermedad del dengue» incluye preferiblemente la prevención de la DHF y/o del DSS. En el contexto de la prevención de la enfermedad del dengue en sujetos de edad avanzada, la expresión «prevención de la enfermedad del dengue» incluye preferiblemente la prevención de manifestaciones graves del dengue tales como hepatomegalia e insuficiencia renal aguda en los órganos afectados.

Tal como se usa en el presente documento, «prevenir la enfermedad del dengue» hace referencia a la prevención del desarrollo en un sujeto de uno o más síntomas de la enfermedad del dengue a causa de una infección con un virus del dengue. En particular, la prevención de la enfermedad del dengue se logra al vacunar o inocular a un sujeto con una formulación de vacuna contra el dengue, tal como la dosis unitaria reconstituida descrita en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, la expresión «tratamiento profiláctico de la enfermedad del dengue» es equivalente a «prevención de la enfermedad del dengue». En una modalidad particular, prevenir la enfermedad del dengue incluye prevenir DHS y/o DSS.

Tal como se usa en el presente documento, «vacunar» o «inocular» hace referencia a la administración de una vacuna a un sujeto, con el objetivo de evitar que el sujeto desarrolle uno o más síntomas de una enfermedad. Tal como se utiliza en el presente documento, «vacunar contra la enfermedad del dengue» o «inocular contra la enfermedad del dengue» hace referencia a la administración de una composición de vacuna del dengue a un sujeto, con el objetivo de prevenir que el sujeto desarrolle uno o más síntomas de la enfermedad del dengue. En principio, el método comprende una vacunación primaria y opcionalmente una o más vacunas de refuerzo. La vacunación primaria se define como el programa de administración primaria para administrar la composición o dosis unitaria tal como se describe en el presente documento para establecer una respuesta inmunitaria protectora y, p. ej., consiste en dos administraciones, p. ej., en un lapso de tres meses. Siempre que se menciona una administración en la presente descripción, esa administración hace referencia a la vacunación primaria a menos que se especifique como vacunación de refuerzo. La vacunación de refuerzo hace referencia a una administración o un programa de administración que tiene lugar después de la vacunación primaria, p. ej., al menos 1 año o incluso 5 o 10 años después de la última administración, p. ej., la segunda administración,

del programa de vacunación primaria. La administración de refuerzo tiene como objetivo, p. ej., mejorar la respuesta inmunitaria de la vacunación primaria.

Tal como se usan en el presente documento, los términos «sujeto» o «sujetos» se limitan a sujetos humanos (p. ej., bebés, niños o adultos). Las expresiones «sujeto de edad avanzada» o «sujetos de edad avanzada» hacen referencia a sujetos de más de 60 años de edad, por ejemplo, de 61 años a 100 años, de 61 años a 90 años, de 61 años a 80 años, de 61 años a 75 años o de 61 años a 70 años.

Tal como se usa en el presente documento, «población de sujetos» hace referencia a un grupo de sujetos. La población de sujetos puede hacer referencia a al menos 40 sujetos, al menos 50 sujetos, al menos 60 sujetos, al menos 100 sujetos o al menos 1000 sujetos y está definida por determinados parámetros. Los parámetros que pueden usarse para definir una población de sujetos incluyen, de modo no taxativo, la edad de los sujetos, si los sujetos provienen de una región con dengue endémico o de una región sin dengue endémico y el estado serológico de los sujetos.

Tal como se usa en el presente documento, «endémica» hace referencia a una región donde una enfermedad o un agente infeccioso está presente constantemente y/o habitualmente prevalece en una población dentro de esta región. Tal como se usa en el presente documento, «no endémica» hace referencia a una región en la que la enfermedad está ausente o en la que habitualmente no es prevalente. Por consiguiente, una «región con dengue endémico» hace referencia a áreas geográficas en las que la infección con el virus del dengue se mantiene constantemente en un nivel inicial. Una «región sin dengue endémico» es un área geográfica en la que la infección con el virus del dengue no se mantiene constantemente en un nivel inicial. Por consiguiente, las poblaciones de sujetos o los sujetos «de una región con dengue endémico» o «de una región sin dengue endémico» hacen referencia a poblaciones de sujetos o a sujetos que viven en áreas geográficas tales como las que se definieron anteriormente. Se puede determinar si un área geográfica o una población de sujetos es endémica en cuanto al dengue mediante diferentes métodos de cálculo, tales como los descritos en Bhatt et al. (2013) *Nature* 496 (7446): 504-507 y material complementario y en Stanaway et al. (2016) *Lancet Infect Dis.* 16(6): 712-723 y material complementario. La OMS o los CDC publican periódicamente resúmenes de las regiones con dengue endémico y de la epidemiología del dengue. Las regiones con dengue endémico típicas se encuentran en América Latina, el Sudeste Asiático y las islas del Pacífico, y los países con dengue endémico incluyen, de modo no taxativo, Australia, Brasil, Bangladés, Colombia, China, República Dominicana, Indonesia, India, México, Malasia, Nicaragua, Nigeria, Pakistán, Panamá, Filipinas, Puerto Rico, Singapur, Sri Lanka, Tailandia y Vietnam. La fuerza de infección del área se mide mediante encuestas de seroprevalencia proporcionadas como el índice de seroprevalencia. Se considera que las zonas con una fuerza de infección muy elevada tienen un índice de seroprevalencia de más del 80 %. Tal como

se usa en el presente documento, el término «región», en lo respectivo a los índices de seroprevalencia, hace referencia a un área geográfica donde se podría determinar o conocer el índice de seroprevalencia, p. ej., una aldea, un pueblo, una ciudad, una región, un condado, un estado, una provincia, o partes de las opciones anteriores o un país entero.

5 Tal como se usa en el presente documento, «estado serológico» hace referencia a la cantidad de anticuerpos que tiene un sujeto con respecto a un determinado agente infeccioso, en particular el virus del dengue. Tal como se usa en el presente documento, «seronegativo» significa que el sujeto no tiene anticuerpos neutralizantes contra ninguno de los serotipos de dengue DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 en el suero. Un sujeto o una población de sujetos seronegativos se define por un
10 valor de anticuerpos neutralizantes de menos de 10 para cada uno de los cuatro serotipos de dengue. Un sujeto o una población de sujetos que tiene un valor de anticuerpos neutralizantes de 10 o más para al menos un serotipo de dengue se define como «seropositivo» con respecto a dicho serotipo de dengue. El estado serológico inicial hace referencia al estado serológico antes de la administración de una composición de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente
15 documento.

Tal como se usa en el presente documento, un «valor de anticuerpos neutralizantes» hace referencia a la cantidad de anticuerpos en el suero de un sujeto que neutralizan el serotipo de dengue respectivo. El valor de anticuerpos neutralizantes contra DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4 se determina en una muestra de suero del sujeto mediante métodos conocidos tales como la prueba
20 de neutralización por reducción en placas (PRNT, por su sigla en inglés) tal como se describe en las Directrices de la OMS (Departamento de Inmunización y Vacunas Biológicas de la Organización Mundial de la Salud (2007), Guidelines for plaque reduction neutralization testing of human antibodies to dengue viruses, OMS/IVB/07.07) o un ensayo de microneutralization (MNT50) tal como se describe en el presente documento. Tal como se usa en el presente documento, la «relación de
25 no más de 20 para el valor de anticuerpos neutralizantes del serotipo 2 del dengue con respecto al valor de anticuerpos neutralizantes del serotipo 4 del dengue» significa que el valor de anticuerpos neutralizantes del serotipo 2 del dengue se divide por el valor de anticuerpos neutralizantes del serotipo 4 del dengue y que la relación obtenida de ese modo no es de más de 20. En otras palabras, el valor de anticuerpos neutralizantes del serotipo 2 del dengue no es más de 20 veces mayor que
30 el valor de anticuerpos neutralizantes del serotipo 4 del dengue en el sujeto.

Tal como se usan en el presente documento, las expresiones «media geométrica del valor de anticuerpos neutralizantes» y «GMT» hacen referencia al valor medio geométrico del valor de anticuerpos neutralizantes contra el serotipo de dengue correspondiente en el suero de sujetos en una población de sujetos. El valor medio geométrico se calcula mediante una fórmula muy conocida.

35 Tal como se usa en el presente documento, la «relación de no más de 20 para el GMT del serotipo 2

con respecto al GMT del serotipo 4 del dengue» significa que la media geométrica del valor de anticuerpos neutralizantes del serotipo 2 del dengue (GMT de DENV-2) se divide por la media geométrica del valor de anticuerpos neutralizantes del serotipo 4 del dengue (GMT de DENV-4) y que la relación obtenida de ese modo no es de más de 20. En otras palabras, la media geométrica del valor de anticuerpos neutralizantes del serotipo 2 del dengue no es más de 20 veces mayor que la media geométrica del valor de anticuerpos neutralizantes del serotipo 4 del dengue en la población de sujetos.

Tal como se usa en el presente documento, una «respuesta inmunitaria» hace referencia a la respuesta de un sujeto a la administración de la vacuna contra el dengue. En particular, la respuesta inmunitaria incluye la formación de anticuerpos neutralizantes contra uno o más serotipos de dengue. También puede incluir la estimulación de una respuesta mediada por células o la formación de anticuerpos contra proteínas no estructurales tales como NS1. Se estimula una respuesta inmunitaria mediante la administración de una dosis unitaria de la invención tal como se describe en el presente documento, si el valor de anticuerpos neutralizantes contra al menos un serotipo del virus del dengue y preferiblemente contra los cuatro serotipos del virus del dengue aumenta después de dicha administración de dicha dosis unitaria. Se estimula una respuesta inmunitaria mediante la administración de una dosis unitaria de la invención tal como se describe en el presente documento, si la secreción de interferón gamma por parte de células mononucleares de sangre periférica estimuladas con péptidos de proteínas del virus del dengue aumenta después de dicha administración de dicha dosis unitaria. Se estimula una respuesta inmunitaria mediante la administración de una dosis unitaria de la invención tal como se describe en el presente documento, si el valor de anticuerpos para proteínas no estructurales tales como NS1 aumenta después de dicha administración de dicha dosis unitaria. En una modalidad particular, la administración de una dosis unitaria reconstituida de la presente invención tal como se describe en el presente documento estimula la formación de anticuerpos neutralizantes contra uno o más serotipos de dengue, una respuesta mediada por células y la formación de anticuerpos contra proteínas no estructurales tales como NS1.

Tal como se usa en el presente documento, una «respuesta inmunitaria equilibrada» significa que la respuesta inmunitaria a los cuatro serotipos de dengue es suficiente para proporcionar protección contra la infección por los cuatro serotipos de dengue y preferiblemente la respuesta inmunitaria a los cuatro serotipos de dengue tiene una fuerza similar. En particular, el valor de anticuerpos neutralizantes contra los cuatro serotipos de dengue el día 180 o el día 365 después de la administración de una primera dosis unitaria reconstituida de la invención tal como se describe en el presente documento es similar, es decir, difiere en menos de un factor 30, en menos de un factor 25 o en menos de un factor 20.

Un virus de ARN puede caracterizarse mediante su secuencia de ARN. De manera alternativa o adicional, también es una práctica común caracterizar el genoma de los virus de ARN mediante las secuencias de ADN correspondientes y se entiende fácilmente que las secuencias de ADN correspondientes reflejan el genoma de ARN en el virus. Por lo tanto, la referencia a «t» o «timina» en toda la descripción ha de entenderse como una referencia a «u» o «uracilo», respectivamente, si se pretende hacer referencia a la secuencia genómica del virus del ARN.

Formulación de vacuna contra el dengue

La presente invención está relacionada con una formulación de vacuna contra el dengue que comprende una composición de virus del dengue tetravalente que comprende un serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado, un serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado, un serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado y un serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado (p. ej. TDV-1, TDV-2, TDV-3 y TDV-4, es decir «TAK-003»), al menos un disacárido no reductor (p. ej., trehalosa y/o sacarosa), al menos un poloxámero (p. ej., poloxámero 407), urea, al menos un aminoácido con una cadena lateral de carga positiva y con un pH neutro (p. ej., arginina, lisina y/o histidina), trometamina (p. ej., trometamina en su forma de base libre y clorhidrato de trometamina), y seroalbúmina humana. En determinadas modalidades, la formulación de vacuna contra el dengue comprende sacarosa. En determinadas otras modalidades, la formulación de vacuna contra el dengue no tiene sacarosa.

En determinadas modalidades, la formulación de vacuna contra el dengue está libre de manitol y/o sorbitol.

En una modalidad preferida, la formulación de vacuna contra el dengue de la invención comprende una composición de virus del dengue tetravalente (p. ej., TDV-1, TDV-2, TDV-3 y TDV-4, es decir, «TAK-003») y una composición de excipientes que comprende trehalosa, poloxámero, urea, clorhidrato de arginina, trometamina y seroalbúmina humana.

En una modalidad, la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento comprende, además de la composición de excipientes descrita en el párrafo anterior, sales de fosfato, tales como dihidrogenofosfato de potasio o hidrogenofosfato disódico.

En una modalidad, la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento comprende, además de la composición de excipientes descrita en los dos párrafos anteriores, sales de cloruro, tales como cloruro de sodio o cloruro de potasio. Las «sales de adición de ácidos» tales como el clorhidrato de arginina o el clorhidrato de trometamina no son sales de cloruro en el sentido de la presente invención. En una modalidad, la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento comprende además ácido clorhídrico.

Formulaciones secas

En un aspecto de la invención, la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento se encuentra en forma de una formulación seca, a saber, una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca. Se puede obtener una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca mediante la liofilización de una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa. La formulación seca puede almacenarse y reconstituirse con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyección o solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM, antes de la administración. Se prefiere que la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada sea el producto final después de la fabricación y la forma de almacenamiento de la formulación de vacuna contra el dengue.

En una modalidad preferida, la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tiene un contenido de humedad residual tal como se determina mediante determinación de Karl Fischer de 5.0 % p/p o menos, preferiblemente 3.0 % p/p o menos. En determinadas modalidades, el contenido de humedad residual varía de 0.1 % p/p a 5 % p/p o de 0.1 % p/p a 3 % p/p o de 0.1 % p/p a 2 % p/p o menos de 2 % p/p o de 0.1 % p/p a 1 % p/p. En una modalidad particularmente preferida, la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tiene un contenido de humedad residual de menos de 1 % p/p, más preferiblemente menos de 0.9 % p/p, o menos de 0.8 % p/p.

En una modalidad, se obtiene una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada al someter la formulación de vacuna contra el dengue acuosa tal como se describe en el presente documento a liofilización. En una modalidad preferida, la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada tiene un contenido de humedad residual tal como se determina mediante determinación de Karl Fischer de 5.0 % p/p o menos, preferiblemente 3.0 % p/p o menos. En determinadas modalidades, el contenido de humedad residual varía de 0.1 % p/p a 5 % p/p o de 0.1 % p/p a 3 % p/p o de 0.1 % p/p a 2 % p/p o de 0.1 % p/p a 1 % p/p. En una modalidad particularmente preferida, la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada tiene un contenido de humedad residual de menos de 1 % p/p, más preferiblemente menos de 0.9 % p/p, o menos de 0.8 % p/p.

En una modalidad, se obtiene una dosis unitaria liofilizada al someter un volumen de 0.5 mL de la formulación de vacuna contra el dengue acuosa tal como se describe en el presente documento a liofilización. En una modalidad preferida, se obtiene una dosis unitaria liofilizada al someter un volumen de alrededor de 0.25 mL de la formulación acuosa de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento a liofilización.

En una modalidad, una dosis unitaria liofilizada está presente en un recipiente, preferiblemente un vial, y dicha dosis unitaria se administra a un sujeto después de la reconstitución. En una modalidad, más de una dosis unitaria (p. ej., cinco dosis unitarias) de la composición de vacuna contra el dengue

están presentes en un recipiente, preferiblemente un vial, de forma tal que con el contenido de un recipiente, preferiblemente un vial, más de un sujeto (p. ej., cinco sujetos) puedan ser vacunados. En una modalidad, se usa un recipiente, preferiblemente un vial, que comprende más de una dosis unitaria (p. ej., cinco dosis unitarias) de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento para proporcionar la dosis unitaria reconstituida que se ha de usar en los métodos de la invención tal como se describe en el presente documento.

En determinadas modalidades, el recipiente que comprende una o más dosis unitarias (p. ej., de una a diez dosis unitarias) de la formulación de vacuna contra el dengue de la invención es parte de un kit. Por lo tanto, la invención está dirigida en parte a un kit para preparar una formulación de vacuna contra el dengue reconstituida que comprenda una formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca (p. ej., una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada) y un diluyente farmacéuticamente aceptable para la reconstitución.

En determinadas modalidades, el diluyente para la reconstitución se proporciona en un recipiente, preferiblemente un vial o una jeringa precargada. En algunas modalidades, el diluyente para la reconstitución se selecciona de entre agua para inyección, solución salina amortiguada con fosfato o una solución acuosa de cloruro de sodio. En una modalidad preferida, el diluyente para la reconstitución es cloruro de sodio a entre 30 y 40 mM, tal como una solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM.

En una modalidad de la invención, cuando una dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca es parte de un kit para preparar una dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida, una alícuota (p. ej., 0.5 mL/dosis unitaria) de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución acuosa de cloruro de sodio) para la reconstitución se proporciona en un recipiente, preferiblemente un vial. En una modalidad de la invención, cuando cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca son parte de un kit, se proporcionan cinco alícuotas (p. ej., 2.5 mL) de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable (p. ej., solución acuosa de cloruro de sodio) en un recipiente, preferiblemente un vial. Por consiguiente, en determinadas modalidades, un kit para preparar múltiples dosis unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida comprende a) un recipiente, tal como un vial, que comprende múltiples dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca, y b) un recipiente, tal como un vial, que comprende múltiples alícuotas de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable para la reconstitución, donde la cantidad de alícuotas corresponde a la cantidad de dosis unitarias.

En una modalidad de ese tipo, una alícuota tiene un volumen de alrededor de 0.4 a 0.8 mL/dosis unitaria, preferiblemente de alrededor de 0.4 a 0.7 mL/dosis unitaria, más preferiblemente de

alrededor de 0.45 a 0.65 mL/dosis unitaria, tal como 0.5 mL/dosis unitaria.

También se contemplan dentro de la presente invención kits de piezas que comprendan uno o más recipientes para la formulación de vacuna contra el dengue, tales como viales, tal como se describió en los párrafos anteriores. En determinadas modalidades de ese tipo, un kit comprende múltiples, por ejemplo, diez, viales para la formulación de vacuna contra el dengue, donde cada vial comprende cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento. En una modalidad, un kit comprende uno o más recipientes para el diluyente y uno o más recipientes para la formulación de vacuna contra el dengue, tales como viales. En determinadas modalidades de ese tipo, un kit comprende diez viales para la formulación de vacuna contra el dengue, donde cada vial comprende cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento y más de un recipiente para el diluyente para preparar cincuenta dosis unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida.

Formulaciones acuosas

En un aspecto, la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento es una formulación líquida, a saber, una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa. Una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa puede someterse a un procedimiento de secado, tal como la liofilización, para obtener una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca.

En determinadas modalidades de ese tipo, la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que se somete a un proceso de secado, tal como la liofilización, comprende alrededor de 5 a 15 % p/v, preferiblemente alrededor de 6 a 12 % p/v, más preferiblemente alrededor de 8 a 11 % p/v de trehalosa (p. ej. alrededor de 9 % p/v de α,α -trehalosa en función de 10 % p/v de dihidrato de α,α -trehalosa), alrededor de 0.05 a 1.0 % p/v, preferiblemente alrededor de 0.1 a 0.5 % p/v, más preferiblemente alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v de poloxámero (p. ej., alrededor de 0.3 % p/v de Kolliphor P407), alrededor de 0.05 a 1.0 % p/v, preferiblemente alrededor de 0.1 a 0.5 % p/v, más preferiblemente alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v de urea (p. ej., alrededor de 0.3 % p/v de urea), alrededor de 0.05 a 1.0 % p/v, preferiblemente 0.1 a 0.5 % p/v, más preferiblemente alrededor de 0.2 a 0.3 % p/v de clorhidrato de arginina (p. ej., alrededor de 0.25 % p/v de clorhidrato de L-arginina), alrededor de 0.01 a 0.5 % p/v, preferiblemente alrededor de 0.02 a 0.5 % p/v, más preferiblemente alrededor de 0.05 a 0.15 % p/v de trometamina (p. ej., alrededor de 0.12 % p/v de trometamina en la forma de la base libre o alrededor de 0.02 % p/v de trometamina en combinación con alrededor de 0.13 % p/v de trometamina HCl, es decir, trometamina a alrededor de 10 mM), y alrededor de 0.01 a 0.5 % p/v, preferiblemente alrededor de 0.02 a 0.5 % p/v, más preferiblemente alrededor de

0.05 a 0.15 % p/v de seroalbúmina humana (p. ej., alrededor de 0.1 % p/v de seroalbúmina humana).

En determinadas modalidades de ese tipo, están contenidas pequeñas cantidades de sales de fosfato y sales de cloruro en la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que se somete a un proceso de secado, tal como la liofilización, comprende menos de 0.1 % p/v, preferiblemente alrededor de 0.01 a 0.06 % p/v, más preferiblemente alrededor de 0.01 a 0.04 % p/v de sales de fosfato (p. ej., alrededor de 0.028 % p/v de hidrogenofosfato disódico dihidrato y 0.004 % p/v de dihidrogenofosfato de potasio), y menos de 0.5 % p/v, preferiblemente alrededor de 0.01 a 0.3 % p/v, más preferiblemente alrededor de 0.01 a 0.25 % p/v de sales de cloruro (p. ej., alrededor de 0.22 % p/v de cloruro de sodio y 0.003 % p/v de cloruro de potasio).

Una cantidad reducida de sales de cloruro ayuda a reducir el tiempo para liofilizar la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento.

En determinadas modalidades de ese tipo, la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que se somete a un procedimiento de secado, tal como liofilización, comprende alrededor de 9 a 11 % p/v, tal como alrededor de 10 % p/v de trehalosa, alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v, tal como alrededor de 0.3 % p/v de poloxámero, alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v, tal como alrededor de 0.3 % p/v de urea, alrededor de 0.2 a 0.3 % p/v, tal como alrededor de 0.25 % p/v de clorhidrato de arginina, alrededor de 0.05 a 0.15 % p/v, tal como alrededor de 0.1 % p/v de trometamina y alrededor de 0.05 a 0.15 % p/v, tal como alrededor de 0.1 % p/v de seroalbúmina humana.

En determinadas modalidades de ese tipo, el pH de la formulación de la vacuna contra el dengue en forma acuosa es de alrededor de 7.0 a alrededor de 8.5, preferiblemente de alrededor de 7.3 a 8.0, más preferiblemente de alrededor de 7.4 a 7.6, tal como alrededor de 7.4, o alrededor de 7.5, o alrededor de 7.6, de acuerdo con el método de evaluación USP <791> para mediciones de pH de la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos.

Se puede utilizar ácido clorhídrico para ajustar el pH. Por lo tanto, en una modalidad, el ácido clorhídrico está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento. En otras modalidades, preferiblemente en modalidades donde la trometamina se proporciona mediante una combinación de trometamina y trometamina HCl, no se añade ácido clorhídrico a la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento. Puede usarse trometamina HCl para ajustar el pH sin la necesidad de ácido clorhídrico. Por lo tanto, en una modalidad preferida, se usa trometamina HCl para ajustar el pH.

También se puede formar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa a partir de una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca como una formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida. En una modalidad, una dosis unitaria reconstituida se obtiene al someter la dosis unitaria liofilizada a reconstitución con un diluyente farmacéuticamente aceptable,

preferiblemente antes de la administración de la vacuna contra el dengue.

En determinadas modalidades de ese tipo, la reconstitución se logrará mediante la adición de un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como agua para inyección o una solución acuosa de cloruro de sodio, a la dosis unitaria liofilizada. En una modalidad, se añade una solución acuosa de cloruro de sodio, tal como una solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM, a la dosis unitaria liofilizada para la reconstitución.

Por lo tanto, en una modalidad, se puede obtener una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa al reconstituir la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, se puede obtener una dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa al reconstituir una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca con una alícuota de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, se puede obtener una dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa al reconstituir múltiples dosis unitarias (p. ej., cinco dosis unitarias) de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca con múltiples alícuotas (p. ej., cinco alícuotas) de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, donde la cantidad de alícuotas corresponde a la cantidad de dosis unitarias, y retirar 0.5 mL de la formulación de vacuna contra el dengue reconstituida.

En una modalidad, es posible obtener cinco dosis unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa al reconstituir cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca con cinco alícuotas de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable.

En una modalidad, se usa un recipiente, preferiblemente un vial, que comprende la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento, para proporcionar la formulación de vacuna contra el dengue reconstituida. En determinadas modalidades de ese tipo, el recipiente comprende una dosis unitaria o más de una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento.

En una modalidad preferida, se usa un recipiente, preferiblemente un vial, que comprende múltiples dosis unitarias (p. ej., al menos cinco dosis unitarias) de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento, para proporcionar la formulación de vacuna contra el dengue reconstituida que se ha de usar en los métodos de la invención tal como se describe en el presente documento.

En una modalidad de ese tipo, la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada se reconstituirá con entre 0.4 y 0.8 mL/dosis unitaria, o entre 0.4 y 0.7 mL/dosis unitaria, o entre 0.45 y 0.65 mL/dosis

unitaria, tal como 0.5 mL/dosis unitaria de diluyente. En una modalidad preferida, la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada se reconstituye con 0.5 mL/dosis unitaria de una solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM. En otra modalidad preferida, la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada se reconstituye con solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM hasta un volumen de 0.5 mL/dosis unitaria. En una modalidad, la dosis unitaria reconstituida que se ha de administrar por vía subcutánea o intramuscular tiene un volumen de 0.5 mL. La formulación reconstituida de la vacuna contra el dengue se ajusta a las consideraciones fisiológicas de pH, osmolaridad y tonicidad. En determinadas modalidades de ese tipo, el pH de la formulación reconstituida es de alrededor de 7.0 a alrededor de 8.5, tal como alrededor de 7.4, o alrededor de 7.5, o alrededor de 7.6, de acuerdo con el método de evaluación USP <791> para mediciones de pH de la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos.

En una modalidad, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable tiene un pH a 25 °C de alrededor de 7.0 a 8.5, preferiblemente alrededor de 7.3 a 8.0, más preferiblemente alrededor de 7.4 a 7.8, o alrededor de 7.6.

En una modalidad, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL tiene un pH a 25 °C de alrededor de 7.0 a 8.5, preferiblemente alrededor de 7.0 a 8.0, más preferiblemente alrededor de 7.3 a 7.8, o alrededor de 7.4.

En determinadas modalidades de ese tipo, la osmolalidad de la formulación reconstituida es de alrededor de 100 a alrededor de 700 mOsmol/kg, tal como alrededor de 300 mOsmol/kg de acuerdo con el método de evaluación USP <785> para las mediciones de osmolalidad de la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos.

En una modalidad, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable tiene una osmolalidad de alrededor de 100 a 700 mOsmol/kg, preferiblemente de alrededor de 100 a menos de 700 mOsmol/kg, más preferiblemente de alrededor de 100 a 400 mOsmol/kg, o alrededor de 300 mOsmol/kg.

En una modalidad, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL tiene una osmolalidad de alrededor de 100 a 700 mOsmol/kg, preferiblemente de alrededor de 100 a menos de 700 mOsmol/kg, más preferiblemente de alrededor de 100 a 500 mOsmol/kg.

Composición de excipientes

La formulación de vacuna contra el dengue de la invención comprende preferiblemente una combinación de trehalosa, al menos un poloxámero, urea, clorhidrato de arginina, trometamina y seroalbúmina humana.

La trometamina puede usarse en su forma de base libre o, p. ej., en forma de una sal de adición de ácido (p. ej., clorhidrato de trometamina, también conocido como «Tris-HCl»), o como una combinación de dos formas. En una modalidad preferida, en la preparación se utiliza una mezcla de trometamina (base) y clorhidrato de trometamina. A menos que se indique lo contrario, la trometamina contenida en la formulación de vacuna contra el dengue se calcula en función de la trometamina en forma de base libre. P. ej., cuando en la preparación se usa a) 0.01 mmol (igual a 1.21 mg) de trometamina o b) 0.01 mmol (igual a 1.58 mg) de clorhidrato de trometamina, la cantidad de trometamina en la formulación de vacuna contra el dengue es, dentro del significado de la invención, en ambos casos 1.21 mg, es decir, 0.01 mmol.

En particular, la presencia de trometamina, urea y clorhidrato de arginina ayuda a mejorar la estabilidad de la formulación de vacuna contra el dengue que contiene seroalbúmina humana tal como se describe en el presente documento. La presencia de trometamina ayuda particularmente a evitar cambios de pH durante la congelación. Los cambios de pH contribuyen a la pérdida de potencia para el virus a causa de cambios conformacionales en la estructura del virus.

En una modalidad, la trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.05 a 1.0 mg/dosis unitaria, preferiblemente alrededor de 0.1 a 0.6 mg/dosis unitaria, más preferiblemente alrededor de 0.2 a 0.5 mg/dosis unitaria. Esto es, en caso de que la dosis unitaria se administre en un volumen de 0.5 mL, la trometamina contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 0.05 a 1.0 mg/0.5 mL, preferiblemente alrededor de 0.1 a 0.6 mg/0.5 mL, más preferiblemente alrededor de 0.2 a 0.5 mg/0.5 mL.

En una modalidad, la trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 10.0 μ mol/dosis unitaria, preferiblemente en una cantidad de 0.1 a 6.0 μ mol/dosis unitaria, más preferiblemente en una cantidad de 1.0 a 3.0 μ mol/dosis unitaria. Esto es, en caso de que la dosis unitaria se administre en un volumen de 0.5 mL, la trometamina contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 0.1 a 10.0 μ mol/0.5 mL, preferiblemente en una cantidad de 0.1 a 6.0 μ mol/0.5 mL, más preferiblemente en una cantidad de 1.0 a 3.0 μ mol/0.5 mL.

En una modalidad, la trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p, preferiblemente alrededor de 0.1 a 3.0 % p/p, más preferiblemente alrededor de 0.5 a 2.0 % p/p.

La trehalosa puede ser α,α -trehalosa, el poloxámero puede ser poloxámero 407, el clorhidrato de arginina puede ser clorhidrato de L-arginina, la seroalbúmina humana puede ser una seroalbúmina

humana natural o puede comprender seroalbúmina humana recombinante (rHSA, por su sigla en inglés).

En una modalidad preferida, el poloxámero es poloxámero 407. Un poloxámero es un copolímero en tribloque no iónico compuesto por una cadena hidrofóbica central de poli(óxido de propileno) flanqueada por dos cadenas hidrofílicas de poli(óxido de etileno). La longitud de los bloques poliméricos puede personalizarse, lo que da lugar a diferentes poloxámeros con propiedades ligeramente diferentes. «Poloxámero 407», tal como se usa en el presente documento, es un tensioactivo no iónico hidrofílico que consiste en un copolímero en tribloque que consiste en un bloque central de propilenglicol con alrededor de 56 unidades de repetición y dos bloques flanqueantes de polietilenglicol de carácter hidrofílico que comprenden cada uno alrededor de 101 unidades de repetición. El «poloxámero 407» también se conoce por sus nombres comerciales Pluronic F127 y Synperonic PE/F127.

En una modalidad, la relación de la cantidad de clorhidrato de arginina con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 4:1, preferiblemente alrededor de 2:1 a 3:1.

En una modalidad, la relación de la cantidad de clorhidrato de arginina con respecto a la cantidad de trometamina contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 3:1, preferiblemente alrededor de 1.5:1 a 2.5:1.

En una modalidad, la relación de la cantidad de urea con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 5:1, preferiblemente alrededor de 2:1 a 4:1.

En una modalidad, la relación de la cantidad de urea con respecto a la cantidad de clorhidrato de arginina contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 2:1.

En una modalidad, la relación de la cantidad de urea con respecto a la cantidad de poloxámero contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 2:1.

En una modalidad, la relación de la cantidad de trehalosa con respecto a la cantidad de urea contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 20:1 a 40:1, preferiblemente alrededor de 25:1 a 35:1.

En una modalidad, la relación de la cantidad de clorhidrato de arginina con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 4:1, y la seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 1.0 % p/p en función del peso seco de la formulación de vacuna.

En una modalidad, la formulación de vacuna contra el dengue comprende trehalosa, poloxámero, urea, clorhidrato de arginina, trometamina, seroalbúmina humana, sales de cloruro y sales de

fosfato. Preferiblemente, las sales de cloruro comprenden o consisten en cloruro de sodio y cloruro de potasio. Preferiblemente, las sales de fosfato comprenden o consisten en dihidrogenofosfato de potasio y hidrogenofosfato disódico. Con máxima preferencia, los excipientes son una combinación que consiste en dihidrato de α,α -trehalosa, poloxámero 407 (Kolliphor® P407 (F-127)), urea, clorhidrato de L-arginina, trometamina, Tris-HCl, seroalbúmina humana, dihidrogenofosfato de potasio, hidrogenofosfato disódico dihidrato, cloruro de potasio y cloruro de sodio.

En determinadas modalidades de ese tipo, las sales de cloruro están contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos del 4.0 % p/p en función del peso seco de la formulación de vacuna, las sales de fosfato están contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 1.0 % p/p en función del peso seco de la formulación de vacuna, y la relación de la cantidad de clorhidrato de arginina con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 4:1.

En determinadas modalidades, las sales de fosfato están contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos del 1.0 % p/p, o de alrededor de 0.05 a 0.5 % p/p, preferiblemente alrededor de 0.2 a 0.4 % p/p, más preferiblemente 0.3 % p/p o menos, en función del peso seco de la formulación de vacuna.

En determinadas modalidades, las sales de cloruro están contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 4.0 % p/p, o alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p, en función del peso seco de la formulación de vacuna.

En una modalidad, el ácido clorhídrico está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 1.0 % p/p, o alrededor de 0.05 a 0.5 % p/p, preferiblemente alrededor de 0.2 a 0.4 % p/p, más preferiblemente alrededor de 0.3 % p/p o menos, en función del peso seco de la formulación de vacuna.

En una modalidad, el clorhidrato de arginina está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 5.0 % p/p de clorhidrato de arginina, la urea está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 6.0 % p/p de urea, la seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p, la trehalosa está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 65 a 95 % p/p, el poloxámero está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p, y la trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p, en función del peso seco de la formulación de vacuna. En determinadas modalidades de ese tipo, las sales de fosfato pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 1.0 % p/p,

o alrededor de 0.05 a 0.5 % p/p, y/o las sales de cloruro pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 4.0 % p/p, o alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p, en función del peso seco de la formulación de vacuna.

- 5 En determinadas modalidades preferidas, el clorhidrato de arginina está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.5 a 5.0 % p/p, la urea está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.5 a 5.0 % p/p, la seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.0 % p/p, la trehalosa está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 70 a 95 % p/p, el poloxámero está contenido en la
- 10 formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 5.0 % p/p, y la trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 3.0 % p/p, en función del peso seco de la formulación de vacuna. En determinadas modalidades de ese tipo, las sales de fosfato pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.2 a 0.4 % p/p y/o las sales de cloruro pueden
- 15 estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 4.0 % p/p, o alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p, en función del peso seco de la formulación de vacuna. En otras modalidades más preferidas, el clorhidrato de arginina está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 1.0 a 4.0 % p/p, la urea está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 1.0 a 4.0 % p/p, la
- 20 seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 1.5 % p/p, la trehalosa está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 75 a 95 % p/p, el poloxámero está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.5 a 4.0 % p/p, y la
- 25 trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.5 a 2.0 % p/p, en función del peso seco de la formulación de vacuna. En determinadas modalidades de ese tipo, las sales de fosfato pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de 0.3 % p/p o menos, y/o las sales de cloruro pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 4.0 % p/p, o alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p, en función del peso seco de la formulación de vacuna.
- 30 En modalidades particularmente preferidas, el clorhidrato de arginina está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 2.0 a 3.0 % p/p, tal como alrededor de 2.4 % p/p, la urea está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 2.0 a 4.0 % p/p, tal como alrededor de 2.9 % p/p, la seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a
- 35 1.0 % p/p, o 1.0 % p/p o menos, la trehalosa está contenida en la formulación de vacuna contra el

dengue en una cantidad de al menos 80 % p/p, tal como 80 % p/p a 95 % p/p, u 80 % p/p a 90 % p/p, u 85 % p/p a 95 % p/p, u 85 % p/p a 90 % p/p, o alrededor de 87 %p/p, el poloxámero está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 2.9 % p/p o menos, y la trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de
5 menos de 2.0 % p/p, tal como alrededor de 1.2 % p/p, en función del peso seco de la formulación de vacuna. En determinadas modalidades de ese tipo, las sales de fosfato pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de 0.3 % p/p o menos, y/o las sales de cloruro pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 4.0 % p/p, o alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p, en función del peso seco de la formulación de
10 vacuna.

En modalidades particularmente preferidas, el clorhidrato de arginina está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 2.0 a 3.0 % p/p, tal como alrededor de 2.4 % p/p, la urea está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 2.0 a 4.0 % p/p, tal como alrededor de 2.9 % p/p, la seroalbúmina humana
15 está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.5 a 1.5 % p/p, tal como alrededor de 1.0 % p/p, la trehalosa está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 85 a 90 % p/p, tal como alrededor de 87 %p/p, el poloxámero está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 2.0 a 4.0 % p/p, tal como alrededor de 2.9 % p/p, y la trometamina está contenida en
20 la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.5 a 2.0 % p/p, tal como alrededor de 1.2 % p/p, en función del peso seco de la formulación de vacuna. En determinadas modalidades de ese tipo, las sales de fosfato pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.2 a 0.4 % p/p, tal como alrededor de 0.3 % p/p y/o las sales de cloruro pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en
25 una cantidad de alrededor de 1.0 a 3.0 % p/p, tal como alrededor de 1.9 % p/p, en función del peso seco de la formulación de vacuna.

En una modalidad, el cloruro de sodio está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 1.0 a 3.0 % p/p, preferiblemente 2.1 % p/p o menos, tal como 1.9 % p/p, en función del peso seco de la formulación de vacuna. En una modalidad, el cloruro de potasio
30 está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.01 a 0.05 % p/p, preferiblemente 0.03 % p/p o menos en función del peso seco de la formulación de vacuna.

En una modalidad, el clorhidrato de arginina está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.0 mg/dosis unitaria, la urea está contenida en la
35 formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 3.0 mg/dosis unitaria,

la seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.05 a 0.5 mg/dosis unitaria, la trehalosa está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 14 a 34 mg/dosis unitaria, o alrededor de 20 a 34 mg/dosis unitaria, el poloxámero está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 3.0 mg/dosis unitaria, y la trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.05 a 1.0 mg/dosis unitaria. En determinadas modalidades de ese tipo, las sales de fosfato pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 0.3 mg/dosis unitaria, o alrededor de 0.01 a 0.2 mg/dosis unitaria, y/o las sales de cloruro pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 2.0 mg/dosis unitaria.

En determinadas modalidades preferidas, el clorhidrato de arginina está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.2 a 1.5 mg/dosis unitaria, o alrededor de 0.5 a 1.2 mg/dosis unitaria, la urea está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.0 mg/dosis unitaria, o alrededor de 0.3 a 1.5 mg/dosis unitaria, la seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 0.4 mg/dosis unitaria, la trehalosa está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 16 a 32 mg/dosis unitaria, o alrededor de 22 a 32 mg/dosis unitaria, el poloxámero está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.3 a 1.5 mg/dosis unitaria, y la trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 0.6 mg/dosis unitaria. En determinadas modalidades de ese tipo, las sales de fosfato pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.08 a 0.1 mg/dosis unitaria y/o las sales de cloruro pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 1.0 mg/dosis unitaria.

En modalidades más preferidas, el clorhidrato de arginina está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.5 a 1.0 mg/dosis unitaria, la urea está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.6 a 1.2 mg/dosis unitaria, la seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 0.4 mg/dosis unitaria, la trehalosa está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 18 a 30 mg/dosis unitaria, o alrededor de 23 a 30 mg/dosis unitaria, el poloxámero está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.6 a 1.2 mg/dosis unitaria, y la trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.2 a 0.5 mg/dosis unitaria. En determinadas modalidades de ese tipo, las sales de fosfato pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de 0.1 mg/dosis unitaria

o menos y/o las sales de cloruro pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.55 a 0.75 mg/dosis unitaria.

En modalidades particularmente preferidas, el clorhidrato de arginina está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.6 a 0.8 mg/dosis unitaria,

la urea está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.75 a 1.0 mg/dosis unitaria, la seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.25 a 0.33 mg/dosis unitaria, o 0.3 mg/dosis unitaria o menos, la trehalosa está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una

cantidad de alrededor de 23 a 27 mg/dosis unitaria, o 27 mg/dosis unitaria o menos, el poloxámero está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.75

a 1.0 mg/dosis unitaria, o 1.0 mg/dosis unitaria o menos, y la trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.3 a 0.4 mg/dosis unitaria,

o 0.4 mg/dosis unitaria o menos. En determinadas modalidades de ese tipo, las sales de fosfato pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de

0.1 mg/dosis unitaria o menos y/o las sales de cloruro pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.55 a 0.75 mg/dosis unitaria.

En modalidades con la máxima preferencia, el clorhidrato de arginina está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.5 a 0.7 mg/dosis, la urea

está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.6 a 0.8 mg/dosis, la seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue

en una cantidad de alrededor de 0.2 a 0.3 mg/dosis, la trehalosa está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 19 a 24 mg/dosis (correspondiente a

alrededor de 21 a 27 mg/dosis de α,α -trehalosa dihidrato), el poloxámero está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.6 a 0.8 mg/dosis, y la

trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.2 a 0.4 mg/dosis (por ejemplo, alrededor de 0.2 a 0.35 mg/dosis de trometamina HCl

y alrededor de 0.02 a 0.08 mg/dosis de trometamina en la forma de la base libre). En determinadas modalidades de ese tipo, las sales de fosfato pueden estar contenidas en la formulación de vacuna

contra el dengue en una cantidad de 0.1 mg/dosis o menos, tal como alrededor de 0.06 a 0.1 mg/dosis y/o las sales de cloruro pueden estar contenidas en la formulación de vacuna contra el

dengue en una cantidad de alrededor de 0.4 a 0.6 mg/dosis unitaria. En una modalidad preferida, la dosis se administra en un volumen de 0.5 mL.

En una modalidad, el cloruro de sodio está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de 0.72 mg/dosis unitaria o menos. En una modalidad, el cloruro de potasio está

contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de 0.01 mg/dosis unitaria

o menos.

En una modalidad, el ácido clorhídrico está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.01 a 0.5 mg/dosis unitaria, preferiblemente menos de 0.2 mg/dosis unitaria, o alrededor de 0.07 a 0.1 mg/dosis unitaria, más preferiblemente 0.1 mg/dosis unitaria o menos.

En una modalidad, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable comprende el clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 0.5 a 5.0 g/L, la urea en una concentración de alrededor de 0.1 a 6.0 g/L, la seroalbúmina humana en una concentración de alrededor de 0.1 a menos de 1 g/L, la trehalosa en una concentración de alrededor de 40 a 80 g/L, el poloxámero en una concentración de alrededor de 0.1 a 5.0 g/L, y la trometamina en una concentración de alrededor de 0.1 a 1.5 g/L. En determinadas modalidades de ese tipo, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable puede comprender además sales de fosfato en una concentración de menos de 0.3 g/L, o alrededor de 0.16 a 0.22 g/L, y/o sales de cloruro en una concentración de menos de 5 g/L.

En una modalidad, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL comprende el clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 0.5 a 5.0 g/L, la urea en una concentración de alrededor de 0.1 a 6.0 g/L, la seroalbúmina humana en una concentración de alrededor de 0.1 a menos de 1 g/L, la trehalosa en una concentración de alrededor de 40 a 80 g/L, el poloxámero en una concentración de alrededor de 0.1 a 5.0 g/L, y la trometamina en una concentración de alrededor de 0.1 a 1.5 g/L. En determinadas modalidades de ese tipo, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL puede comprender además sales de fosfato en una concentración de menos de 0.3 g/L, o alrededor de 0.13 a 0.22 g/L, y/o sales de cloruro en una concentración de menos de 5 g/L.

En una modalidad preferida, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable comprende el clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 0.5 a menos de 2.5 g/L, la urea en una concentración de alrededor de 0.5 a menos de 3.0 g/L, la seroalbúmina humana en una concentración de alrededor de 0.3 a 0.9 g/L, la trehalosa en una concentración de alrededor de 40 a 70 g/L, el poloxámero en una concentración de alrededor de 0.5 a menos de 3.0 g/L, y la trometamina en una concentración de alrededor de 0.5 a menos de 1.2 g/L. En determinadas modalidades de ese tipo, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma

seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable puede comprender además sales de fosfato en una concentración de 0.22 g/L o menos, tal como alrededor de 0.18 g/L, y/o sales de cloruro en una concentración de alrededor de 3.3 a 3.6 g/L.

En una modalidad preferida, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL comprende el clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 0.5 a menos de 2.5 g/L, la urea en una concentración de alrededor de 0.5 a menos de 3.0 g/L, la seroalbúmina humana en una concentración de alrededor de 0.3 a 0.9 g/L, la trehalosa en una concentración de alrededor de 40 a 70 g/L, el poloxámero en una concentración de alrededor de 0.5 a menos de 3.0 g/L, y la trometamina en una concentración de alrededor de 0.5 a menos de 1.2 g/L.

En determinadas modalidades de ese tipo, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL puede comprender además sales de fosfato en una concentración de 0.22 g/L o menos, tal como alrededor de 0.13 g/L, y/o sales de cloruro en una concentración de alrededor de 3.1 a 3.6 g/L.

En una modalidad más preferida, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable comprende el clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 1.3 a 1.65 g/L, la urea en una concentración de alrededor de 1.5 a 2.0 g/L, la seroalbúmina humana en una concentración de alrededor de 0.5 a 0.7 g/L, la trehalosa en una concentración de alrededor de 45 a 60 g/L, el poloxámero en una concentración de alrededor de 1.5 a 2.0 g/L, y la trometamina en una concentración de alrededor de 0.5 a 1.0 g/L. En determinadas modalidades de ese tipo, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable puede comprender además sales de fosfato en una concentración de 0.22 g/L o menos, tal como alrededor de 0.18 g/L, y/o sales de cloruro en una concentración de 3.6 g/L o menos tal como alrededor de 3.4 g/L.

En una modalidad incluso más preferida, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL comprende el clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 1.0 a 1.65 g/L, la urea en una concentración de alrededor de 1.0 a 2.0 g/L, la seroalbúmina humana en una concentración de alrededor de 0.4 a 0.7 g/L, la trehalosa en una concentración de alrededor de 40 a 48 g/L (correspondiente a alrededor de 44 a 53 g/L de α,α -trehalosa dihidrato), el poloxámero en una concentración de alrededor de 1.0 a 2.0 g/L, y la trometamina en una concentración de alrededor de 0.5 a 1.0 g/L (por ejemplo, alrededor de 0.5 a 0.7 g/L de trometamina-HCl y alrededor de 0.05 a 0.2 g/L de trometamina en la forma de la base libre). En determinadas

modalidades de ese tipo, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable tal como solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM hasta un volumen de 0.5 mL puede comprender además sales de fosfato en una concentración de 0.22 g/L o menos, tal como alrededor de 0.16 g/L, y/o sales de cloruro en una concentración de 3.6 g/L o menos, tal como alrededor de 3.1 g/L.

En una modalidad preferida particular, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable comprende el clorhidrato de arginina en una concentración de 1.65 g/L o menos, tal como alrededor de 1.4 g/L, la urea en una concentración de alrededor de 2.0 g/L o menos, tal como alrededor de 1.65 g/L, la seroalbúmina humana en una concentración de alrededor de 0.7 g/L o menos, tal como alrededor de 0.6 g/L, la trehalosa en una concentración de 60 g/L o menos, tal como alrededor de 55 g/L, el poloxámero en una concentración de alrededor de 2.0 g/L o menos, tal como alrededor de 1.65 g/L, y la trometamina en una concentración de alrededor de 0.8 g/L o menos, tal como alrededor de 0.7 g/L. En determinadas modalidades de ese tipo, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable puede comprender además sales de fosfato en una concentración de 0.22 g/L o menos, tal como alrededor de 0.18 g/L, y/o sales de cloruro en una concentración de 3.6 g/L o menos tal como alrededor de 3.4 g/L.

En una modalidad con la máxima preferencia, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL comprende el clorhidrato de arginina en una concentración de 1.65 g/L o menos, tal como alrededor de 1.2 g/L, la urea en una concentración de alrededor de 2.0 g/L o menos, tal como alrededor de 1.4 g/L, la seroalbúmina humana en una concentración de alrededor de 0.7 g/L o menos, tal como alrededor de 0.5 g/L, la trehalosa en una concentración de 60 g/L o menos, tal como alrededor de 43 g/L, el poloxámero en una concentración de alrededor de 2.0 g/L o menos, tal como alrededor de 1.4 g/L, y la trometamina en una concentración de alrededor de 0.8 g/L o menos, tal como alrededor de 0.6 g/L. En determinadas modalidades de ese tipo, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable tal como solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM hasta un volumen de 0.5 mL puede comprender además sales de fosfato en una concentración de 0.22 g/L o menos, tal como alrededor de 0.13 g/L, y/o sales de cloruro en una concentración de 3.6 g/L o menos, tal como alrededor de 3.1 g/L.

En una modalidad, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable comprende cloruro de sodio en una concentración de menos

de 5 g/L, preferiblemente alrededor de 3.3 a 3.6 g/L, más preferiblemente 3.6 g/L o menos tal como alrededor de 3.4 g/L.

En una modalidad, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL comprende cloruro de sodio en una
5 concentración de menos de 5 g/L, preferiblemente alrededor de 3.1 a 3.6 g/L, más preferiblemente 3.6 g/L o menos tal como alrededor de 3.1 g/L.

En una modalidad, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente
10 acuoso farmacéuticamente aceptable comprende ácido clorhídrico en una concentración de alrededor de 0.05 a 0.3 g/L, preferiblemente alrededor de 0.15 a 0.19 g/L, más preferiblemente 0.19 g/L o menos, tal como alrededor de 0.16 g/L.

En una modalidad, una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca tras la reconstitución con un diluyente acuoso
15 farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL comprende ácido clorhídrico en una concentración de alrededor de 0.05 a 0.3 g/L, preferiblemente alrededor de 0.15 a 0.19 g/L, más preferiblemente 0.19 g/L o menos, tal como alrededor de 0.14 g/L.

Las concentraciones de excipientes después de la reconstitución también pueden expresarse en cantidad por dosis. En una modalidad preferida, una dosis que se ha de administrar en 0.5 mL
20 contiene o consiste en los siguientes excipientes: dihidrato de α,α -trehalosa en una cantidad de 18 a 30 mg/dosis, preferiblemente 20 a 28 mg/dosis, más preferiblemente 22 a 26 mg/dosis (p. ej. 23.64 mg/dosis), poloxámero (p. ej., Kolliphor® P407 (F127)) en una cantidad de 0.1 a 1.5 mg/dosis, preferiblemente 0.5 a 1.0 mg/dosis, más preferiblemente 0.6 a 0.8 mg/dosis (p. ej., 0.71 mg/dosis), seroalbúmina humana en una cantidad de 0.05 a 0.5 mg/dosis, preferiblemente 0.05 a 0.4 mg/dosis,
25 más preferiblemente 0.1 a 0.3 mg/dosis (p. ej., 0.24 mg/dosis), trometamina en una cantidad de 0.1 a 0.7 μ moles/dosis, preferiblemente 0.2 a 0.6 μ moles/dosis, más preferiblemente 0.3 a 0.5 μ moles/dosis (p. ej., 0.39 μ moles/dosis), Tris HCl en una cantidad de 0.5 a 6.0 μ moles/dosis, preferiblemente 1.0 a 5.0 μ moles/dosis, más preferiblemente 1.0 a 3.0 μ moles/dosis (p. ej., 1.97 μ moles/dosis), L-Arginina HCl en una cantidad de 0.5 a 8.0 μ moles/dosis, preferiblemente 1.0 a 6.0
30 μ moles/dosis, más preferiblemente 2.0 a 4.0 μ moles/dosis (p. ej., 2.81 μ moles/dosis), Urea en una cantidad de 5.0 a 20.0 μ moles/dosis, preferiblemente 8.0 a 16.0 μ moles/dosis, más preferiblemente 10.0 a 14.0 μ moles/dosis (p. ej., 11.81 μ moles/dosis), dihidrogenofosfato de potasio en una cantidad de 0.001 a 1.0 μ moles/dosis, preferiblemente 0.01 a 0.1 μ moles/dosis, más preferiblemente 0.05 a 0.09 μ moles/dosis (p. ej., 0.07 μ moles/dosis), hidrogenofosfato disódico dihidrato en una cantidad
35 de 0.01 a 1.0 μ moles/dosis, preferiblemente 0.1 a 0.6 μ moles/dosis, más preferiblemente 0.3 a 0.5

µmoles/dosis (p. ej., 0.38 µmoles/dosis), cloruro de potasio en una cantidad de 0.001 a 1.0 µmoles/dosis, preferiblemente 0.01 a 0.5 µmoles/dosis, más preferiblemente 0.05 a 0.2 µmoles/dosis (p. ej., 0.10 µmoles/dosis) y cloruro de sodio en una cantidad de 15.0 a 40.0 µmoles/dosis, preferiblemente 15.0 a 35.0 µmoles/dosis, más preferiblemente 25.0 a 30.0 µmoles/dosis (p. ej., 26.66 µmoles/dosis).

En una modalidad, la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento se encuentra presente en un recipiente, tal como un vial. En determinadas modalidades de ese tipo, el clorhidrato de arginina está contenido en el recipiente en una cantidad de alrededor de 1.5 a 7.5 mg, la urea en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg, la seroalbúmina humana en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.5 mg, la trehalosa en una cantidad de alrededor de 100 a 170 mg, el poloxámero en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg y la trometamina en una cantidad de alrededor de 0.5 a 4.0 mg. En una modalidad preferida, el clorhidrato de arginina está contenido en el recipiente en una cantidad de alrededor de 2.0 a 6.0 mg, la urea está contenida en una cantidad de alrededor de 3.0 a 7.0 mg, la seroalbúmina humana está contenida en una cantidad de alrededor de 0.5 a 2.0 mg, la trehalosa está contenida en una cantidad de alrededor de 120 a 170 mg, el poloxámero está contenido en una cantidad de alrededor de 4.0 a 6.0 mg y la trometamina está contenida en una cantidad de alrededor de 1.0 a 3.0 mg. En una modalidad más preferida, el clorhidrato de arginina está contenido en el recipiente en una cantidad de alrededor de 3.0 a 5.0 mg, la urea en una cantidad de alrededor de 4.0 a 6.0 mg, la seroalbúmina humana en una cantidad de alrededor de 1.0 a 2.0 mg, la trehalosa en una cantidad de alrededor de 140 a 160 mg, el poloxámero en una cantidad de alrededor de 4.0 a 6.0 mg y la trometamina en una cantidad de alrededor de 1.0 a 3.0 mg. En una modalidad preferida particular, el clorhidrato de arginina está contenido en el recipiente en una cantidad de alrededor de 3.5 a 4.5 mg, tal como alrededor de 4.1 mg, la urea en una cantidad de alrededor de 4.5 a 5.5 mg, tal como alrededor de 4.95 mg, la seroalbúmina humana en una cantidad de alrededor de 1.5 a 1.8 mg, tal como alrededor de 1.65 mg, la trehalosa en una cantidad de alrededor de 145 a 155 mg, tal como alrededor de 149 mg, el poloxámero en una cantidad de alrededor de 4.5 a 5.5 mg, tal como alrededor de 4.95 mg, y la trometamina en una cantidad de alrededor de 1.5 a 2.5 mg, tal como alrededor de 2.0 mg.

En una modalidad preferida, las cantidades de excipientes descritas en el párrafo anterior están contenidas en un recipiente, tal como un vial, que comprende cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue para proporcionar cinco dosis unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida.

Composición de virus del dengue tetravalente

5

10

15

20

25

30

35

Cepas del virus del dengue

El virus del dengue es un virus de ARN monocatenario de sentido positivo de la familia flaviviridae. La taxonomía se indicará en la Tabla 1. La familia flaviviridae incluye tres géneros: flavivirus, hepatitis virus y pestivirus. El género flavivirus contiene virus de la fiebre altamente patógenos y potencialmente hemorrágicos, tales como el virus de la fiebre amarilla y el virus del dengue, virus encefalíticos, tales como el virus de la encefalitis japonesa, el virus de la encefalitis del valle del Murray y el virus del Nilo Occidental, y varios virus menos patógenos.

Tabla 1. Taxonomía del virus del dengue de la cepa original TDV

Familia	Flaviviridae
Género	Flavivirus
Especie	Virus del dengue
Cepas	Serotipo 2 del dengue (cepa 16681), cepa DEN-2 PDK-53
TDV original	TDV-2

El genoma del flavivirus comprende en dirección 5' a 3' (véase la **Fig. 3**):

- una región 5'-no codificante (5'-NCR),
- una región codificante de la proteína de la cápside (C),
- una región codificante de la proteína premembrana (prM),
- una región codificante de la proteína de envoltura (E),
- una región codificante de proteínas no estructurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) y
- una región 3' no codificante (3'-NCR).

Las proteínas estructurales virales son C, prM y E, y las proteínas no estructurales son NS1 a NS5. Las proteínas estructurales y no estructurales se traducen en una sola poliproteína y son procesadas por proteasas celulares y virales.

La formulación de vacuna contra el dengue de la invención tal como se describe en el presente documento comprende una composición de virus del dengue tetravalente que comprende cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado que representan el serotipo 1 del dengue, el serotipo 2 del dengue, el serotipo 3 del dengue y el serotipo 4 del dengue. Preferiblemente, la composición comprende virus del dengue quiméricos y opcionalmente al menos un virus del dengue no quimérico. Por ejemplo, la composición de virus del dengue tetravalente puede comprender cuatro serotipos de dengue vivo atenuado DENV-1, DENV-2, DENV-3 y DENV-4, de los cuales al menos uno es una quimera dengue-dengue y los otros serotipos son cada uno una quimera dengue-dengue o un

serotipo de dengue no quimérico. En particular, la composición de virus del dengue comprende una cepa de serotipo 2 del dengue clonada y caracterizada molecularmente derivada de la cepa del virus DEN-2 PDK-53 vivo atenuado (TDV-2), y tres cepas quiméricas del dengue derivadas de la cepa TDV-2 mediante el reemplazo de las proteínas estructurales prM y E de TDV-2 con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos de dengue, lo que da como resultado las siguientes cepas quiméricas de dengue:

- una quimera de DENV-2/1 (TDV-1),
- una quimera de DENV-2/3 (TDV-3) y
- una quimera de DENV-2/4 (TDV-4);

un ejemplo no taxativo de cuatro cepas de dengue adecuadas de ese tipo son las cuatro sustancias medicinales de TAK-003, que están disponibles a nivel commercial en el producto «Qdenga».

La vacuna contra el dengue tetravalente modificada genéticamente, TDV, se basa en una cepa del virus del dengue-2 clonada y caracterizada molecularmente (TDV-2). Esta cepa TDV-2 atenuada se generó mediante la clonación de ADNc de la cepa del virus DEN-2 PDK-53 atenuado producida en el laboratorio que se aisló originalmente en la Universidad Mahidol, Bangkok, Tailandia (Kinney et al. (1997) Virology 230(2): 300-308). Se generó DEN-2 PDK-53 mediante 53 pases en serie en células renales primarias de perros (PDK, por su sigla en inglés) a 32 °C (Bhamarapravati et al. (1987) Bull. World Health Organ. 65(2): 189-195).

La cepa de DEN-2 PDK-53 atenuada (precursora de TDV-2) se obtuvo a partir de la cepa de virus en estado natural DEN-2 16681 y difiere en nueve nucleótidos con respecto a la versión en estado natural, y se caracteriza de la siguiente manera (Kinney et al. (1997) Virology 230(2): 300-308):

- (i) región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57 C a T): locus de atenuación principal
- (ii) prM-29 Asp a Val (nt-524 A a T)
- (iii) mutación silenciosa de nt-2055 C a T (E)
- (iv) NS1-53 Gly a Asp (nt-2579 G a A): locus de atenuación principal
- (v) NS2A-181 Leu a Phe (nt-4018 C a T)
- (vi) NS3-250 Glu a Val (nt-5270 A a T): locus de atenuación principal
- (vii) mutación silenciosa de nt-5547 (gen NS3) T a C
- (viii) NS4A-75 Gly a Ala (nt-6599 G a C)

* mutación silenciosa de nt-8571 C a T (gen NS5)

Los tres cambios de nucleótidos ubicados en la región 5' no codificante (NCR) (nucleótido 57) (mutación (i)), los genes NS-1 (aminoácido 828 de SEQ ID NO. 4) (mutación (iv)) y NS-3 (aminoácido 1725 de SEQ ID NO. 4) (mutación (vi)) forman la base para el fenotipo de atenuación de la cepa DEN-2 PDK-53 (Butrapet et al. (2000) J. Virol. 74(7): 3111-3119) (Tabla 2). En el presente documento se hace referencia a estas tres mutaciones como las «mutaciones de atenuación», que

están comprendidas en TDV-1, TDV-2, TDV-3 y TDV-4.

Tabla 2. Mutaciones de atenuación en la estructura principal genética común de todas las cepas de TDV

Ubicación de la mutación	Cambio de nucleótidos en TDV-2	Cambio de aminoácidos en TDV-2
Región 5' no codificante (5'-NCR)	57 C a T	No aplicable (de carácter silencioso)
Proteína no estructural 1 (NS1)	2579 G a A	828 Gly a Asp
Proteína no estructural 3 (NS3)	5270 A a T	1725 Glu a Val

En una modalidad, TDV-2 comprende, además de las tres mutaciones de atenuación, una o más mutaciones seleccionadas de entre:

- una mutación en el gen prM en el nucleótido 524 de adenina a timina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 143 de ácido aspártico a valina, y/o
- una mutación silenciosa en el gen E en el nucleótido 2055 de citosina a timina, y/o
- una mutación en el gen NS2A en el nucleótido 4018 de citosina a timina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 1308 de leucina a fenilalanina, y/o
- una mutación silenciosa en el gen NS3 en el nucleótido 5547 de timina a citosina, y/o
- una mutación en el gen NS4A en el nucleótido 6599 de guanina a citosina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 2168 de glicina a alanina, y/o
- una mutación silenciosa en el gen prM en el nucleótido 900 de timina a citosina.

La mutación silenciosa en el gen NS5 en el nucleótido 8571 de citosina a timina de DEN-2 PDK-53 no se encuentra presente en la cepa TDV-2.

En otra modalidad, TDV-2 comprende, además de las tres mutaciones de atenuación, una o más mutaciones seleccionadas de entre:

- una mutación en el gen prM en el nucleótido 592 de adenina a guanina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 166 de lisina a ácido glutámico, y/o
- una mutación en el gen NS5 en el nucleótido 8803 de adenina a guanina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 2903 de isoleucina a valina.

En otra modalidad, TDV-2 comprende, además de las tres mutaciones de atenuación, las mutaciones a) y g), preferiblemente las mutaciones a), g), c), e) y h), más preferiblemente las mutaciones a), g), c), e), h) y b), incluso más preferiblemente las mutaciones a), g), c), e), h), b) y d), y con máxima preferencia las mutaciones a) a h). Las posiciones de nucleótidos y posiciones de aminoácidos de TDV-2 hacen referencia a la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ

ID NO. 3 y a la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO. 4.

La proteína de envoltura estructural (E) y la proteína de la premembrana (prM) del virus del dengue se han identificado como los antígenos primarios que provocan una respuesta de anticuerpos protectores neutralizantes (Plotkin 2001). Para la creación de la vacuna contra el dengue tetravalente (TDV), se modificó TDV-2 mediante el reemplazo de la secuencia de ácido nucleico que codifica las glucoproteínas prM y E de DENV-2 con la secuencia de ácido nucleico que codifica las correspondientes glucoproteínas prM y E de las cepas en estado natural de DENV-1, DENV-3 y DENV-4: DENV-1 16007, DENV-3 16562 o DENV-4 1036, respectivamente (véase la Tabla 3) mediante métodos convencionales de ingeniería genética molecular (Huang et al. (2003) J. Virol. 77(21): 11436-11447).

Tabla 3. Origen viral de las regiones del gen prM/E de las cepas de virus TDV

Virus	Cepa	Origen	Fuente	Referencia	Secuencia de nucleótidos	Secuencia de aminoácidos
DENV-1	16007	Tailandia, 1964	DHF/DSS paciente	Halstead y Simasthien, 1970	SEQ ID NO. 9	SEQ ID NO. 10
DENV-2	16681	Tailandia, 1964	DHF/DSS paciente	Halstead y Simasthien, 1970	SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 12
DENV-3	16562	Filipinas, 1964	paciente con DHF	Halstead y Simasthien, 1970	SEQ ID NO. 13	SEQ ID NO. 14
DENV-4	1036	Indonesia, 1976	paciente con DF	Gubler et al., 1979	SEQ ID NO. 15	SEQ ID NO. 16

En la **Fig. 3** se muestra un diagrama de las cuatro cepas de TDV comprendidas en la formulación de vacuna contra el dengue.

Las cepas quiméricas de dengue TDV-1, TDV-3 y TDV-4 expresan los antígenos de la superficie prM y E de los virus DENV-1, DENV-3 o DENV-4, tal como se mostró en la Tabla 3, respectivamente, y conservan las alteraciones genéticas responsables de la atenuación de TDV-2. Por lo tanto, cada una de las cepas TDV-1, TDV-3 y TDV-4 comprende las mutaciones de atenuación descritas en la Tabla 2.

En una modalidad, TDV-1 comprende, además de las tres mutaciones de atenuación, una o más

mutaciones seleccionadas de entre:

c) una mutación en el gen NS2A en el nucleótido 4018 de citosina a timina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 1308 de leucina a fenilalanina, y/o

d) una mutación silenciosa en el gen NS3 en el nucleótido 5547 de timina a citosina, y/o

5 e) una mutación en el gen NS4A en el nucleótido 6599 de guanina a citosina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 2168 de glicina a alanina, y/o

i) una mutación silenciosa en el gen E en el nucleótido 1575 de timina a citosina, y/o

j) una mutación silenciosa en el sitio de unión entre el gen prM-E y la estructura principal de DEN-2 PDK-53 en el nucleótido 453 de adenina a guanina, y/o

10 k) una mutación en el sitio de unión entre el gen prM-E y la estructura principal de DEN-2 PDK-53 en los nucleótidos 2381/2382 de timina-guanina a citosina-citosina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 762 de valina a alanina.

En otra modalidad, TDV-1 comprende, además de las tres mutaciones de atenuación, una o más mutaciones seleccionadas de entre:

15 l) una mutación en el gen NS2A en el nucleótido 3823 de adenina a citosina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 1243 de isoleucina a leucina, y/o

m) una mutación en el gen NS2B en el nucleótido 4407 de adenina a timina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 1437 de ácido glutámico a ácido aspártico, y/o

n) una mutación silenciosa en el gen NS4B en el nucleótido 7311 de adenina a guanina.

20 En otra modalidad, la cepa TDV-1 comprende, además de las tres mutaciones de atenuación, las mutaciones l) y m), preferiblemente las mutaciones l), m), c) y e), incluso más preferiblemente las mutaciones l), m), c), e), d) y n), y con máxima preferencia las mutaciones l), m), c), e), d), n), i), j) y k). Las posiciones de nucleótidos y posiciones de aminoácidos de TDV-1 hacen referencia a la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO. 1 y a la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO. 2.

25 En una modalidad, TDV-3 comprende, además de las tres mutaciones de atenuación, una o más mutaciones seleccionadas de entre:

c) una mutación en el gen NS2A en el nucleótido 4012 de citosina a timina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 1306 de leucina a fenilalanina, y/o

30 d) una mutación silenciosa en el gen NS3 en el nucleótido 5541 de timina a citosina, y/o

e) una mutación en el gen NS4A en el nucleótido 6593 de guanina a citosina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 2166 de glicina a alanina, y/o

j) una mutación silenciosa en el sitio de unión entre el gen prM-E y la estructura principal de DEN-2 PDK-53 en el nucleótido 453 de adenina a guanina, y/o

35 k) una mutación en el sitio de unión entre el gen prM-E y la estructura principal de DEN-2 PDK-53

en los nucleótidos 2375/2376 de timina-guanina a citosina-citosina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 760 de valina a alanina, y/o

o) una mutación silenciosa en el gen prM en el nucleótido 552 de citosina a timina, y/o

p) una mutación en el gen E en el nucleótido 1970 de adenina a timina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 625 de histidina a leucina.

5

En otra modalidad, TDV-3 comprende, además de las tres mutaciones de atenuación, una o más mutaciones seleccionadas de entre:

q) una mutación en el gen E en el nucleótido 1603 de adenina a timina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 503 de treonina a serina, y/o

r) una mutación silenciosa en el gen NS5 en el nucleótido 7620 de adenina a guanina.

10

En otras modalidades, TDV-3 comprende, además de las tres mutaciones de atenuación, las mutaciones p) y q), preferiblemente las mutaciones p), q), c) y e), incluso más preferiblemente las mutaciones p), q), c), e), d) y r), y con máxima preferencia las mutaciones p), q), c), e), d), r), j), k) y o). Las posiciones de nucleótidos y posiciones de aminoácidos de TDV-3 hacen referencia a la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO. 5 y a la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO. 6.

15

En una modalidad, TDV-4 comprende, además de las tres mutaciones de atenuación, una o más mutaciones seleccionadas de entre:

c) una mutación en el gen NS2A en el nucleótido 4018 de citosina a timina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 1308 de leucina a fenilalanina, y/o

d) una mutación silenciosa en el gen NS3 en el nucleótido 5547 de timina a citosina, y/o

e) una mutación en el gen NS4A en el nucleótido 6599 de guanina a citosina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 2168 de glicina a alanina, y/o

j) una mutación silenciosa en el sitio de unión entre el gen prM-E y la estructura principal de DEN-2 PDK-53 en el nucleótido 453 de adenina a guanina, y/o

k) una mutación en el sitio de unión entre el gen prM-E y la estructura principal de DEN-2 PDK-53 en los nucleótidos 2381/2382 de timina-guanina a citosina-citosina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 762 de valina a alanina, y/o

s) una mutación en el gen C en el nucleótido 396 de adenina a citosina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 100 de arginina a serina, y/o

t) una mutación silenciosa en el gen E en el nucleótido 1401 de adenina a guanina, y/o

u) una mutación en el gen E en el nucleótido 2027 de citosina a timina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 644 de alanina a valina, y/o

v) una mutación en el gen E en el nucleótido 2275 de adenina a citosina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 727 de metionina a leucina.

35

En otra modalidad, TDV-4 comprende, además de las tres mutaciones de atenuación, una o más mutaciones seleccionadas de entre:

w) una mutación silenciosa en el gen C en el nucleótido 225 de adenina a timina, y/o

x) una mutación en el gen NS2A en el nucleótido 3674 de adenina a guanina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 1193 de ácido aspártico a glicina, y/o

y) una mutación en el gen NS2A en el nucleótido 3773 de adenina a una mezcla de adenina/guanina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 1226 de lisina a una mezcla de lisina/arginina, y/o

z) una mutación silenciosa en el gen NS3 en el nucleótido 5391 de citosina a timina, y/o

aa) una mutación en el gen NS4A en el nucleótido 6437 de citosina a timina que deriva en un cambio de aminoácidos en la posición 2114 de alanina a valina, y/o

bb) una mutación silenciosa en el gen NS4B en el nucleótido 7026 de timina a una mezcla de timina/citosina o a citosina, y/o

cc) una mutación silenciosa en el gen NS5 en el nucleótido 9750 de adenina a citosina.

En otra modalidad, TDV-4 comprende, además de las tres mutaciones de atenuación, la mutación s), u) y v), preferiblemente las mutaciones s), u), v), c), e), x), y) y aa), incluso más preferiblemente las mutaciones s), u), v), c), e), x), y), aa) y w), incluso más preferiblemente las mutaciones s), u), v), c), e), x), y), aa), w), d), z), bb) y cc), y con máxima preferencia las mutaciones s), u), v), c), e), x), y), aa), w), d), z), bb), cc), j), k) y t). Las posiciones de nucleótidos y posiciones de aminoácidos de TDV-4 hacen referencia a la secuencia de nucleótidos tal como se muestra en SEQ ID NO. 7 y a la secuencia de aminoácidos tal como se muestra en SEQ ID NO. 8.

En una modalidad preferida, TDV-1 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 1, TDV-2 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 3, TDV-3 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 5, y/o TDV-4 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO. 7. En una modalidad preferida adicional, TDV-1 se caracteriza por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2, TDV-2 se caracteriza por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4, TDV-3 se caracteriza por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 6, y TDV-4 se caracteriza por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 8. En una modalidad preferida adicional, TDV-1 se caracteriza por una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2, TDV-2 se caracteriza por una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4, TDV-3 se caracteriza por una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 6, y TDV-4 se caracteriza por una secuencia de nucleótidos que codifica la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 8.

Tabla 4. Secuencias de las cepas de virus TDV

SEQ ID NO.	cepa del virus del dengue	tipo de secuencia
SEQ ID NO. 1	TDV-1	secuencia de nucleótidos
SEQ ID NO. 2	TDV-1	secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO. 3	TDV-2	secuencia de nucleótidos
SEQ ID NO. 4	TDV-2	secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO. 5	TDV-3	secuencia de nucleótidos
SEQ ID NO. 6	TDV-3	secuencia de aminoácidos
SEQ ID NO. 7	TDV-4	secuencia de nucleótidos
SEQ ID NO. 8	TDV-4	secuencia de aminoácidos

Por lo tanto, en una modalidad particularmente preferida, la formulación de vacuna contra el dengue de la invención tal como se describe en el presente documento comprende las cepas de virus del dengue vivo atenuado TDV-1, TDV-2, TDV-3 y TDV-4, donde TDV-1, TDV-3 y TDV-4 se basan en TDV-2 y comprenden las regiones prM y E de DENV-1, -3 y -4, respectivamente. En otra modalidad particularmente preferida, TDV-1 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 1 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 2, TDV-2 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 3 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 4, TDV-3 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 5 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 6 y TDV-4 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 7 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 8.

La proteína E de DENV-3 tiene dos aminoácidos menos que la proteína E de DENV-2. Por lo tanto, los nucleótidos y la estructura principal de aminoácidos codificados de TDV-2 comienzan después de la región E de DENV-3 en el nucleótido 2374 de SEQ ID NO. 5 y el aminoácido 760 de SEQ ID NO. 6 son 6 nucleótidos menos y 2 aminoácidos menos que las posiciones de nucleótidos y aminoácidos originales de TDV-2, respectivamente.

En una modalidad particularmente preferida, la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento comprende la composición de virus del dengue tetravalente «TAK-003».

Concentraciones de virus

La presente invención está dirigida en parte a una composición de vacuna contra el dengue que comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas de virus del

dengue vivo atenuado:

- (i) un serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) en una concentración de al menos $3.3 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (ii) un serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) en una concentración de al menos $2.7 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, o al menos $3.1 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (iii) un serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) en una concentración de al menos $4.0 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, y
- (iv) un serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) en una concentración de al menos $4.5 \log_{10}$ ufp/0.5 mL.

En una modalidad, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado:

- (i) un serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico tal como TDV-1) preferiblemente en una concentración de al menos $3.3 \log_{10}$ ufp/0.5 mL a $3.8 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (ii) un serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue tal como TDV-2) preferiblemente en una concentración de al menos $2.7 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, o al menos $3.1 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (iii) un serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico tal como TDV-3) en una concentración de al menos $4.0 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, y
- (iv) un serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico tal como TDV-4) preferiblemente en una concentración de al menos $4.5 \log_{10}$ ufp/0.5 mL o $4.6 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, opcionalmente hasta $6.2 \log_{10}$ ufp/0.5 mL.

La presente invención está dirigida además en parte a una dosis unitaria de una composición de vacuna contra el dengue, donde la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado:

- (i) una cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos $3.3 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (ii) una cepa de serotipo 2 de dengue en una concentración de al menos $2.7 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, o al menos $3.1 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (iii) una cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos $4.0 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, y
- (iv) una cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos $4.5 \log_{10}$ ufp/0.5 mL.

En una modalidad, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus

del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado:

- (i) una cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos $3.3 \log_{10}$ ufp/0.5 mL hasta $3.8 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (ii) una cepa de serotipo 2 de dengue en una concentración de al menos $2.7 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, o al menos $3.1 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (iii) una cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos $4.0 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, y
- (iv) una cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos $4.5 \log_{10}$ ufp/0.5 mL o al menos $4.6 \log_{10}$ ufp/0.5 mL hasta opcionalmente $6.2 \log_{10}$ ufp/0.5 mL.

Preferiblemente, la cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico es TDV-1, la cepa de serotipo 2 de dengue es TDV-2, la cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico es TDV-3 y la cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico es TDV-4.

En una modalidad, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde:

- (i) el serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de $3.3 \log_{10}$ ufp/0.5 mL a $5.3 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (ii) el serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de $2.7 \log_{10}$ ufp/0.5 mL a $5.0 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, o de $3.1 \log_{10}$ ufp/0.5 mL a $5.0 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (iii) el serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de $4.0 \log_{10}$ ufp/0.5 mL a $6.0 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, y
- (iv) el serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de $4.5 \log_{10}$ ufp/0.5 mL a $6.5 \log_{10}$ ufp/0.5 mL.

En una modalidad de ese tipo, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde:

- (i) el serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de $3.3 \log_{10}$ ufp/0.5 mL a $5.0 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (ii) el serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de $2.7 \log_{10}$ ufp/0.5 mL a $4.9 \log_{10}$ ufp/0.5 mL o de $3.1 \log_{10}$ ufp/0.5 mL a $4.9 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (iii) el serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de $4.0 \log_{10}$ ufp/0.5 mL a $5.7 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, y
- (iv) el serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de $4.5 \log_{10}$ ufp/0.5 mL a $6.2 \log_{10}$ ufp/0.5 mL.

En una modalidad adicional de ese tipo, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo

atenuado donde:

- (i) un serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 3.3 log₁₀ ufp/dosis a 5.0 log₁₀ ufp/dosis,
- (ii) un serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de 2.7 log₁₀ ufp/dosis a 4.9 log₁₀ ufp/dosis, o de 3.1 log₁₀ ufp/dosis a 4.9 log₁₀ ufp/dosis,
- (iii) un serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.0 log₁₀ ufp/dosis a 5.7 log₁₀ ufp/dosis, y
- (iv) un serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.5 log₁₀ ufp/dosis a 5.5 log₁₀ ufp/dosis.

En una modalidad adicional de ese tipo, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde:

- (i) un serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 3.3 log₁₀ ufp/dosis a 4.1 log₁₀ ufp/dosis,
- (ii) un serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de 2.7 log₁₀ ufp/dosis a 3.6 log₁₀ ufp/dosis, o de 3.1 log₁₀ ufp/dosis a 3.6 log₁₀ ufp/dosis,
- (iii) un serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.0 log₁₀ ufp/dosis a 4.7 log₁₀ ufp/dosis, y
- (iv) un serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.5 log₁₀ ufp/dosis a 5.3 log₁₀ ufp/dosis.

En una modalidad adicional de ese tipo, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde:

- (i) un serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 3.3 log₁₀ ufp/0.5 mL a 3.6 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (ii) un serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de 2.7 log₁₀ ufp/0.5 mL a 4.0 log₁₀ ufp/0.5 mL, o de 3.1 log₁₀ ufp/0.5 mL a 4.0 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (iii) un serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.0 log₁₀ ufp/0.5 mL a 4.6 log₁₀ ufp/0.5 mL, y
- (iv) un serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.5 log₁₀ ufp/0.5 mL o 4.6 log₁₀ ufp/0.5 mL a 5.1 log₁₀ ufp/0.5 mL.

En otra modalidad, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde:

- (i) el serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.3 log₁₀ ufp/0.5 mL a 4.4 log₁₀ ufp/0.5 mL,

(ii) el serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de 3.7 log₁₀ ufp/0.5 mL a 3.8 log₁₀ ufp/0.5 mL,

(iii) el serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.5 log₁₀ ufp/0.5 mL a 5.0 log₁₀ ufp/0.5 mL, y

5 (iv) el serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 5.5 log₁₀ ufp/0.5 mL a 5.6 log₁₀ ufp/0.5 mL.

En otra modalidad particularmente preferida, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde:

10 (i) el serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 3.6 log₁₀ ufp/0.5 mL,

(ii) el serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de 4.0 log₁₀ ufp/0.5 mL,

15 (iii) el serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.6 log₁₀ ufp/0.5 mL, y

(iv) el serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 5.1 log₁₀ ufp/0.5 mL.

En otra modalidad preferida, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas de virus del dengue vivo atenuado donde la suma aritmética de los cuatro serotipos es inferior a 6.7 log₁₀ ufp/0.5 mL, preferiblemente inferior a 5.5 log₁₀ ufp/0.5 mL. En determinadas modalidades de ese tipo, la suma aritmética de los cuatro serotipos es de al menos 4.6 log₁₀ ufp/0.5 mL. En una modalidad preferida, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde la suma aritmética de los cuatro serotipos se encuentra en el intervalo de 4.6 log₁₀ ufp/0.5 mL a 6.7 log₁₀ ufp/0.5 mL, preferiblemente en el intervalo de 4.6 log₁₀ ufp/0.5 mL a 5.5 log₁₀ ufp/0.5 mL.

Preferiblemente, en dichas modalidades, la cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico es TDV-1, la cepa de serotipo 2 de dengue es TDV-2, la cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico es TDV-3 y la cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico es TDV-4. Más preferiblemente, TDV-1 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 1 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 2, TDV-2 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 3 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 4, TDV-3 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 5 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 6 y TDV-4 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 7 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo

con SEQ ID No. 8.

La presente invención está dirigida en parte a una dosis unitaria de una composición de vacuna contra el dengue, donde la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado:

- (i) un serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) en una concentración de al menos $3.3 \log_{10}$ ufp/dosis,
- (ii) un serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) en una concentración de al menos $2.7 \log_{10}$ ufp/dosis, o al menos $3.1 \log_{10}$ ufp/dosis,
- (iii) un serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) en una concentración de al menos $4.0 \log_{10}$ ufp/dosis, y
- (iv) un serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) en una concentración de al menos $4.5 \log_{10}$ ufp/dosis.

En una modalidad, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde:

- (i) el serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de $3.3 \log_{10}$ ufp/dosis a $5.3 \log_{10}$ ufp/dosis,
- (ii) el serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de $2.7 \log_{10}$ ufp/dosis a $5.0 \log_{10}$ ufp/dosis, o de $3.1 \log_{10}$ ufp/dosis a $5.0 \log_{10}$ ufp/dosis
- (iii) el serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de $4.0 \log_{10}$ ufp/dosis a $6.0 \log_{10}$ ufp/dosis, y
- (iv) el serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de $4.5 \log_{10}$ ufp/dosis a $6.5 \log_{10}$ ufp/dosis.

En una modalidad de ese tipo, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde:

- (i) el serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de $3.3 \log_{10}$ ufp/dosis a $5.0 \log_{10}$ ufp/dosis,
- (ii) el serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de $2.7 \log_{10}$ ufp/dosis a $4.9 \log_{10}$ ufp/dosis, o de $3.1 \log_{10}$ ufp/dosis a $4.9 \log_{10}$ ufp/dosis,
- (iii) el serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de $4.0 \log_{10}$ ufp/dosis a $5.7 \log_{10}$ ufp/dosis, y
- (iv) el serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de $4.5 \log_{10}$ ufp/dosis a $6.2 \log_{10}$ ufp/dosis.

En una modalidad adicional de ese tipo, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo

atenuado donde:

- (i) un serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 3.3 log₁₀ ufp/dosis a 5.0 log₁₀ ufp/dosis,
- (ii) un serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de 2.7 log₁₀ ufp/dosis a 4.9 log₁₀ ufp/dosis, o de 3.1 log₁₀ ufp/dosis a 4.9 log₁₀ ufp/dosis,
- (iii) un serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.0 log₁₀ ufp/dosis a 5.7 log₁₀ ufp/dosis, y
- (iv) un serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.5 log₁₀ ufp/dosis a 5.5 log₁₀ ufp/dosis.

En una modalidad adicional de ese tipo, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde:

- (i) un serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 3.3 log₁₀ ufp/dosis a 4.1 log₁₀ ufp/dosis,
- (ii) un serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de 2.7 log₁₀ ufp/dosis a 3.6 log₁₀ ufp/dosis, o de 3.1 log₁₀ ufp/dosis a 3.6 log₁₀ ufp/dosis,
- (iii) un serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.0 log₁₀ ufp/dosis a 4.7 log₁₀ ufp/dosis, y
- (iv) un serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.5 log₁₀ ufp/dosis a 5.3 log₁₀ ufp/dosis.

En una modalidad adicional de ese tipo, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde:

- (i) un serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 3.3 log₁₀ ufp/dosis a 3.6 log₁₀ ufp/dosis,
- (ii) un serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de 2.7 log₁₀ ufp/dosis a 4.0 log₁₀ ufp/dosis, o de 3.1 log₁₀ ufp/dosis a 4.0 log₁₀ ufp/dosis,
- (iii) un serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.0 log₁₀ ufp/dosis a 4.6 log₁₀ ufp/dosis, y
- (iv) un serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.5 log₁₀ ufp/dosis a 5.1 log₁₀ ufp/dosis.

En otra modalidad, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde:

- (i) el serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.3 log₁₀ ufp/dosis a 4.4 log₁₀ ufp/dosis,

(ii) el serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de 3.7 log₁₀ ufp/dosis a 3.8 log₁₀ ufp/dosis,

(iii) el serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.5 log₁₀ ufp/dosis a 5.0 log₁₀ ufp/dosis, y

5 (iv) el serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 5.5 log₁₀ ufp/dosis a 5.6 log₁₀ ufp/dosis.

En una modalidad particularmente preferida, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde:

10 (i) el serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.4 log₁₀ ufp/dosis,

(ii) el serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de 3.8 log₁₀ ufp/dosis,

15 (iii) el serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.5 log₁₀ ufp/dosis, y

(iv) el serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 5.6 log₁₀ ufp/dosis.

En otra modalidad particularmente preferida, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde:

20 (i) el serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 3.6 log₁₀ ufp/dosis,

(ii) el serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) tiene una concentración de 4.0 log₁₀ ufp/dosis,

25 (iii) el serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 4.6 log₁₀ ufp/dosis, y

(iv) el serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tiene una concentración de 5.1 log₁₀ ufp/dosis.

En otra modalidad preferida, la composición de vacuna contra el dengue comprende una
30 composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas de virus del dengue vivo atenuado donde la suma aritmética de los cuatro serotipos es inferior a 6.7 log₁₀ ufp/dosis, preferiblemente inferior a 5.5 log₁₀ ufp/dosis. En determinadas modalidades de ese tipo, la suma aritmética de los cuatro serotipos es al menos 4.6 log₁₀ ufp/dosis. En una modalidad preferida, la
35 composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado donde la suma aritmética

de los cuatro serotipos se encuentra en el intervalo de 4.6 log₁₀ ufp/dosis a 6.7 log₁₀ ufp/dosis, preferiblemente en el intervalo de 4.6 log₁₀ ufp/dosis a 5.5 log₁₀ ufp/dosis.

En una modalidad en la composición (i), (ii), (iii) y (iv) se proporciona una concentración total de ufp/0.5 mL y, en función de dicha concentración, la concentración de (iii) al menos 10 % de la concentración total en ufp/0.5 mL.

En una modalidad, en la composición (i), (ii), (iii) y (iv) se proporciona una concentración total de ufp/0.5 mL y, en función de dicha concentración total, la concentración de (ii) en ufp/0.5 mL es de menos de 10 %, y la concentración de (iv) en ufp/0.5 mL es de al menos 50 %, y la concentración de (i) en ufp/0.5 mL es de al menos 1 % y la concentración de (iii) en ufp/ 0.5 mL es de al menos 8 %, o al menos 10 %, o al menos 12 %, o al menos 14 %, o al menos 16 % o al menos 18 %.

Se prefiere que la concentración en la dosis unitaria reconstituida de (iii) en ufp/0.5 mL sea de al menos 10 %.

En una modalidad, en la composición (i), (ii), (iii) y (iv) se proporciona una concentración total de ufp/0.5 mL y, en función de dicha concentración total, la concentración de (ii) en ufp/0.5 mL es de menos del 2 %, la concentración de (iv) en ufp/0.5 mL es de al menos 50 %, y la concentración de (i) en ufp/0.5 mL es de al menos 1 %, y la concentración de (iii) en ufp/0.5 mL es de al menos 6 %.

Preferiblemente, en dichas modalidades, la cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico es TDV-1, la cepa de serotipo 2 de dengue es TDV-2, la cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico es TDV-3 y la cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico es TDV-4. Más preferiblemente, TDV-1 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 1 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 2, TDV-2 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 3 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 4, TDV-3 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 5 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 6 y TDV-4 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 7 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 8.

La concentración de los diferentes virus del dengue se determina preferiblemente mediante un ensayo de inmunoenfoque conocido en la técnica. Por ejemplo, la concentración puede determinarse mediante un ensayo de inmunoenfoque donde se apliquen diluciones en serie del virus del dengue a monocapas de células adherentes, tales como células Vero. Después de un período de tiempo que permite que los virus infecciosos se unan a las células y sean absorbidos por las células, se añade una capa que contiene agentes espesantes, tales como agarosa o carboximetilcelulosa, para evitar la difusión de los virus, de forma tal que los virus descendientes solamente puedan infectar las células adyacentes a las células infectadas originales. Después de un período de incubación para permitir la replicación viral, las células se fijan y tiñen mediante el uso de anticuerpos

monoclonales contra el dengue con especificidad con respecto al serotipo y un anticuerpo secundario tal como un anticuerpo etiquetado con fosfatasa alcalina. Los focos se tiñen mediante la adición de un sustrato adecuado para la enzima unida al anticuerpo secundario, tal como el sustrato de 5-bromo-4-cloro-3-indolil-fosfato/nitro azul tetrazolio fosfatasa. La cantidad de placas en la placa
5 corresponde a las unidades formadoras de placas del virus en las soluciones aplicadas a las células. Por ejemplo, una concentración de 1000 ufp/μl indica que 1 μl de la solución aplicada a las células contiene suficientes virus como para producir 1000 placas en una monocapa celular.

La composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado, donde una cepa de
10 serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico, una cepa de serotipo 2 de dengue, una cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico y una cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico proporcionan una concentración total en ufp/0.5 mL. La expresión «concentración total en ufp/0.5 mL» o «concentración total en ufp/dosis» es la suma de las concentraciones del serotipo 1 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico), serotipo 2 del dengue
15 (p. ej., la cepa de serotipo 2 de dengue), el serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) y el serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico), preferiblemente la suma de las concentraciones de TDV-1, TDV-2, TDV -3 y TDV-4, y se define como el 100 % de la concentración del virus del dengue tal como se determina en ufp (unidades formadoras de placa) en 0.5 mL o en una dosis.

En una modalidad, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado, donde un
20 serotipo 1 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico), un serotipo 2 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 del dengue), un serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) y un serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) proporcionan una concentración total en ufp/0.5 mL, donde, en
25 función de dicha concentración total, la concentración de un serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) medida en ufp/0.5 mL es menos del 10 % de la concentración total, o menos del 8 %, o menos del 6 % de la concentración total, y donde la concentración de un serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) medida en ufp/0.5 mL es al
30 menos el 50 % o al menos el 60 % o al menos el 65 % de la concentración total. En una modalidad, en función de dicha concentración total, la concentración de un serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) medida en ufp/0.5 mL es de 0.3 a 10 % o de 0.5 a 8 % de la concentración total y la concentración de un serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) medida en ufp/0.5 mL es del 50 % al 90 % o del 60 % al 88 % de la concentración
35 total. Esto significa que la concentración del serotipo 2 de dengue (p. ej., la cepa de serotipo 2 de

dengue) es menor que la concentración del serotipo 4 de dengue (p. ej., la cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico).

En una modalidad de ese tipo, la concentración de un serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) medida en ufp/0.5 mL es al menos el 1 % de la concentración total, y/o la concentración de un serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) medida en ufp/0.5 mL es al menos el 6 % de la concentración total, o al menos el 7 % u 8 %, 10 %, 12 %, 14 %, 16 % o 18 % de la concentración total. En una modalidad de ese tipo, la concentración de un serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) medida en ufp/0.5 mL es del 1 % al 7 % o del 2 % al 6 % o del 2.0 % al 5.0 % de la concentración total, y/o la concentración de un serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) medida en ufp/0.5 mL es del 6 % al 25 % o del 7 % al 25 % o del 10 % al 25 % o del 18 % al 25 % de la concentración total. Esto significa que la concentración del serotipo 1 de dengue (p. ej., la cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) es menor que la concentración del serotipo 3 de dengue (p. ej., la cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico).

En una modalidad preferida, la concentración de una cepa de serotipo 2 de dengue, tal como TDV-2, medida en ufp/0.5 mL es menos del 10 % de la concentración total, preferiblemente menos del 6 % o menos del 2 %, la concentración de un serotipo 4 de dengue (p. ej., la cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico), tal como TDV-4, medida en ufp/0.5 mL, es al menos el 50 % de la concentración total, preferiblemente al menos el 65 %, la concentración de un serotipo 1 de dengue (p. ej., la cepa serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico), tal como TDV-1, medida en ufp/0.5 mL, es al menos el 1 % de la concentración total, preferiblemente entre el 1 % y el 7 % o entre el 2.0 % y el 5.0 %, y la concentración de un serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico), tal como TDV-3, medida en ufp/0.5 mL, es al menos el 6 % de la concentración total, preferiblemente entre el 6 % y el 25 % o entre el 10 % y el 25 % o entre el 18 % y el 25 %.

En una modalidad preferida adicional, se proporciona una composición de virus del dengue que comprende un serotipo 1 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico), un serotipo 2 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue), un serotipo 1 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) y un serotipo 4 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico), tal como TDV-1, TDV-2, TDV-3 y TDV-4, donde la concentración del serotipo 1 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) medida en ufp/0.5 mL es al menos el 1 % de la concentración total, preferiblemente entre el 1 % y 7 % o entre el 2.0 % y 5.0 %, la concentración del serotipo 2 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) medida en ufp/0.5 mL es menos del 10 % de la concentración total,

preferiblemente menos del 6 % o menos del 2 % y la concentración del serotipo 3 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) medida en ufp/ 0.5 mL es al menos el 6 % de la concentración total, preferiblemente entre el 6 % y 25 % o entre el 10 % y 25 % o entre el 18 % y 25 %. Se prefiere particularmente que el serotipo 4 de dengue (p. ej., la cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tenga la concentración más alta de los cuatro serotipos del dengue.

En una modalidad preferida adicional, la composición de vacuna contra el dengue comprende una composición de virus del dengue tetravalente que incluye cuatro cepas del virus del dengue vivo atenuado, donde la concentración del serotipo 1 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) medida en ufp/0.5 mL es del 1 % al 7 % de la concentración total, la concentración del serotipo 2 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2 de dengue) medida en ufp/0.5 mL es menos del 8 % de la concentración total, por ejemplo, en el intervalo del 1 % al 8 % de la concentración total, la concentración del serotipo 3 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) medida en ufp/0.5 mL es al menos el 10 % de la concentración total, y la concentración del serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) medida en ufp/0.5 mL es al menos el 65 % de la concentración total, por ejemplo, en el intervalo del 65 % al 80 %. En determinadas modalidades de ese tipo, la suma aritmética de los cuatro serotipos se encuentra en el intervalo de 4.6 log₁₀ ufp/0.5 mL a 6.7 log₁₀ ufp/0.5 mL, preferiblemente en el intervalo de 4.6 log₁₀ ufp/0.5 mL a 5.5 log₁₀ ufp/0.5 mL.

En una modalidad preferida adicional, el serotipo 1 del dengue (p. ej., la cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tal como TDV-1 y el serotipo 2 del dengue (p. ej., la cepa de serotipo 2 de dengue) tal como TDV-2 se encuentran presentes cada uno en concentraciones en función de la concentración total en ufp/0.5 mL que se encuentran dentro de los 5 % puntos porcentuales entre sí y/o en su conjunto representan menos de alrededor del 10 % de la concentración total en ufp/0.5 mL.

En determinadas modalidades de ese tipo, el serotipo 3 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tal como TDV-3 es preferiblemente al menos alrededor del 10 % de la concentración total en ufp/0.5 mL y más preferiblemente el serotipo 4 de dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico) tal como TDV-4 es al menos alrededor del 70 % de la concentración total en ufp/0.5 mL. En determinadas modalidades de ese tipo, el serotipo 4 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico), tal como TDV-4, representa la concentración más alta en la composición de los cuatro serotipos, preferiblemente con al menos alrededor del 70 % de la concentración total en ufp/0.5 mL, el serotipo 3 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tal como TDV-3 representa la segunda concentración más alta en la composición de los cuatro serotipos, preferiblemente con al menos alrededor del 10 % de la concentración total en ufp/0.5 mL, y el serotipo 1 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico) tal como TDV-1 y el serotipo 2 del dengue (p. ej., cepa de serotipo 2

de dengue de carácter quimérico) tal como TDV-2, representan cada uno concentraciones más bajas que la concentración del serotipo 3 (p. ej. cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico) tal como TDV-3, y opcionalmente representan en su conjunto menos de alrededor del 10 % de la concentración total en ufp/0.5 mL.

5 Preferiblemente, en dichas modalidades, la cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico es TDV-1, la cepa de serotipo 2 de dengue es TDV-2, la cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico es TDV-3 y la cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico es TDV-4. Más preferiblemente, TDV-1 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 1 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 2, TDV-2 se caracteriza por la
10 secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 3 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 4, TDV-3 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 5 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 6 y TDV-4 se caracteriza por la secuencia de nucleótidos de acuerdo con SEQ ID No. 7 y la secuencia de aminoácidos de acuerdo con SEQ ID No. 8.

15 De acuerdo con una modalidad adicional, la cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico, preferiblemente TDV-4, tiene la concentración más alta en la composición de vacuna contra el dengue, seguida por la cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico, preferiblemente TDV-3, seguida por la cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico, preferiblemente TDV-1, seguida por la cepa de serotipo 2 de dengue, preferiblemente TDV-2. Se prefiere particularmente
20 que la cepa de serotipo 2 del dengue tenga la concentración más baja de las cuatro cepas presentes en la composición de la vacuna contra el dengue.

Siempre que se haga referencia a una concentración/0.5 mL, esto no limita el volumen de la dosis unitaria descrita en el presente documento a 0.5 mL. 0.5 mL es el volumen de referencia para la determinación de las concentraciones de las cepas de virus en la composición en ufp/mL. El volumen
25 y/o la cantidad por dosis unitaria se describe en el capítulo respectivo.

Estabilidad del virus

La formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento proporciona una estabilidad superior de la composición de virus del dengue tetravalente que
30 comprende un serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado, un serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado, un serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado y un serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., «TAK-003»), por ejemplo, durante la liofilización y el almacenamiento.

En una modalidad, la cantidad de virus del dengue antes de la liofilización y la cantidad de virus del
35 dengue inmediatamente después de la liofilización de la formulación de vacuna contra el dengue tal

como se describe en el presente documento difiere en menos de 0.46 log₁₀ ufp/dosis unitaria, preferiblemente en menos de 0.4 log₁₀ ufp/dosis unitaria, más preferiblemente en menos de 0.3 log₁₀ ufp/dosis unitaria, o menos de 0.25 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4. Por lo tanto, en una modalidad preferida, la pérdida por liofilización para cada uno de los serotipos 1 a 4 en la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento es de menos de 0.4 log₁₀ ufp/dosis unitaria.

En una modalidad, la cantidad de virus del dengue inmediatamente después de la liofilización y la cantidad de virus del dengue después de la liofilización y el almacenamiento de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento a alrededor de 25 °C y con una humedad relativa del 65 % durante 12 semanas difiere en menos de 1.6 log₁₀ ufp/dosis unitaria, preferiblemente en menos de 1.4 log₁₀ ufp/dosis unitaria, más preferiblemente en menos de 1.2 log₁₀ ufp/dosis unitaria, o menos de 1.0 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4. Por lo tanto, en una modalidad preferida, la pérdida de estabilidad debida al almacenamiento en condiciones aceleradas durante 12 semanas es menos de 1.4 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4.

En una modalidad, la cantidad de virus del dengue inmediatamente después de la liofilización y la cantidad de virus del dengue inmediatamente después de la liofilización y el almacenamiento de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento a 2-8 °C durante 12 meses difiere en menos de 0.44 log₁₀ ufp/dosis unitaria, preferiblemente en menos de 0.4 log₁₀ ufp/dosis unitaria, más preferiblemente en menos de 0.35 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4. Por lo tanto, en una modalidad preferida, la pérdida de estabilidad debido al almacenamiento a 2-8 °C durante 12 meses es de menos de 0.4 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4 en la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento.

En una modalidad, la cantidad de virus del dengue inmediatamente después de la liofilización y la cantidad de virus del dengue inmediatamente después de la liofilización y el almacenamiento de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento a 2-8 °C durante 18 meses difiere en menos de 0.7 log₁₀ ufp/dosis unitaria, preferiblemente en menos de 0.6 log₁₀ ufp/dosis unitaria, más preferiblemente en menos de 0.5 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4. Por lo tanto, en una modalidad preferida, la pérdida de estabilidad debido al almacenamiento a 2-8 °C durante 18 meses es de menos de 0.6 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4 en la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento.

En una modalidad, la cantidad de virus del dengue inmediatamente después de la liofilización y la cantidad de virus del dengue después de la liofilización y el almacenamiento de la formulación de

vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento a 2-8 °C durante 24 meses difieren en menos de 0.7 log₁₀ ufp/dosis unitaria, preferiblemente en menos de 0.6 log₁₀ ufp/dosis unitaria, más preferiblemente en menos de 0.5 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4. Por lo tanto, en una modalidad preferida, la pérdida de estabilidad debido al almacenamiento a 2-8 °C durante 24 meses es de menos de 0.6 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4 en la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento.

En una modalidad, la cantidad de virus del dengue inmediatamente después de la liofilización y la cantidad de virus del dengue después de la liofilización y el almacenamiento de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento a -20 °C durante 24 meses difieren en menos de 0.2 log₁₀ ufp/dosis unitaria, preferiblemente en menos de 0.15 log₁₀ ufp/dosis unitaria, más preferiblemente en menos de 0.1 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4. Por lo tanto, en una modalidad preferida, la pérdida de estabilidad debido al almacenamiento a 2-8 °C durante 24 meses es de menos de 0.15 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4 en la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento.

En una modalidad, la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada como se describe en el presente documento tiene una vida útil de al menos 2 años a 2-8 °C, preferiblemente de más de 2 años a 2-8 °C. En determinadas modalidades de ese tipo, la especificación al final de la vida útil (ESL) para los serotipos del dengue 1 a 4 es al menos 3.3 log₁₀ UFP/dosis para el serotipo 1, al menos 2.7 log₁₀ UFP/dosis para el serotipo 2, al menos 4.0 log₁₀ UFP/dosis para el serotipo 3 y al menos 4.5 log₁₀ UFP/dosis para el serotipo 4. En determinadas otras modalidades, la especificación al final de la vida útil (ESL) para los serotipos del dengue 1 a 4 es al menos 3.3 log₁₀ UFP/dosis para el serotipo 1, al menos 3.1 log₁₀ UFP/dosis para el serotipo 2, al menos 4.0 log₁₀ UFP/dosis para el serotipo 3 y al menos 4.5 log₁₀ UFP/dosis para el serotipo 4.

En una modalidad, la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada tal como se describe en el presente documento proporciona una estabilidad que califica para monitor de viales de vacuna (VVM, por sus siglas en inglés) Tipo 7. Las condiciones para VVM Tipo 7 son: 7 días a 37 °C, 45 días a 25 °C y más de 2 años a 2 °C a 8 °C. Los VVM son pequeños indicadores que se adhieren a los viales de vacunas y cambian de color a medida que la vacuna se expone al calor acumulado, lo que permite a los trabajadores de la salud saber si la vacuna ha superado un límite preestablecido más allá del cual la vacuna no debe utilizarse para inmunización. Dependiendo de la estabilidad de la vacuna a la exposición al calor, a las vacunas se les asigna una categoría de VVM.

En una modalidad, la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada cumple con la especificación al final de la vida útil (ESL) para los serotipos del dengue cuando se expone a 37 °C durante 7 días,

a 25 °C durante 45 días o a 2 °C a 8 °C durante más de 2 años. En tales modalidades, la especificación al final de la vida útil (ESL) para los serotipos del dengue 1 a 4 es al menos 3.3 log₁₀ UFP/dosis para el serotipo 1, al menos 2.7 log₁₀ UFP/dosis o al menos 3.1 log₁₀ UFP/dosis para el serotipo 2, al menos 4.0 log₁₀ UFP/dosis para el serotipo 3 y al menos 4.5 log₁₀ UFP/dosis para el serotipo 4.

En una modalidad, la cantidad de pérdida de estabilidad de virus del dengue debida al almacenamiento de la formulación líquida de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento 2-8 °C durante 30 días es menor de 1.0 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4.

Método de fabricación

La presente invención está dirigida en parte a un método de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca que comprende las siguientes etapas: (a) proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa, (b) congelar la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa para formar una formulación de vacuna contra el dengue congelada, (c) someter la formulación de vacuna contra el dengue congelada a una etapa de secado primario en un aparato con una temperatura de almacenamiento, que se encuentre por encima de la temperatura de transición vítrea T_g de la formulación hasta no más de 25 °C por encima, o no más de 20 °C por encima, o no más de 15 °C por encima de la temperatura de transición vítrea T_g y a una presión por debajo de 0.1 mbar para formar un producto secado primario, y (d) someter el producto secado primario a una etapa de secado secundario en un aparato con una temperatura de almacenamiento, que se encuentre por encima de la temperatura de almacenamiento de la etapa de secado primario y a una presión por debajo de 1 mbar para formar un producto secado secundario.

En particular, la presente invención está dirigida en parte a un método de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que comprenda:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprenda:

(i) un serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado, (ii) un serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado, (iii) un serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, y (iv) un serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado; y

B. una composición de excipientes que comprenda: a. trehalosa, b. poloxámero, c. urea, d. clorhidrato de arginina, e. trometamina, y f. seroalbúmina humana,

(b) congelar la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa en un aparato con una temperatura de almacenamiento por debajo de -35 °C para formar una formulación de vacuna contra el dengue congelada,

(c) someter la formulación de vacuna contra el dengue congelada a una etapa de secado primario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de -31 a -19 °C, o de alrededor de -31 a -21 °C y a una presión por debajo de 0.1 mbar para formar un producto secado primario, y (d) someter el producto secado primario a una etapa de secado secundario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de al menos 15 °C y a una presión por debajo de 1 mbar, preferiblemente por debajo de 0.1 mbar para formar un producto secado secundario.

En particular, la presente invención está dirigida en parte a un método de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento en forma seca que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que comprenda:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprenda:

(i) un serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado, (ii) un serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado, (iii) un serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, y (iv) un serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado; y

B. una composición de excipientes que comprenda: a. trehalosa, b. poloxámero, c. urea, d. clorhidrato de arginina, e. trometamina, y f. seroalbúmina humana,

(b) congelar la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa en un aparato con una temperatura de almacenamiento por debajo de -35 °C para formar una formulación de vacuna contra el dengue congelada,

(c) someter la formulación de vacuna contra el dengue congelada a una etapa de secado primario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de -31 a -19 °C, o de alrededor de -31 a -21 °C y a una presión por debajo de 0.1 mbar para formar un producto secado primario, y (d) someter el producto secado primario a una etapa de secado secundario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de al menos 20 °C y a una presión por debajo de 1 mbar para formar un producto secado secundario.

En una modalidad, la etapa de congelación (b) en el método descrito en los párrafos anteriores se lleva a cabo en un aparato con una temperatura de almacenamiento por debajo de -35 °C o por debajo de -40 °C, preferiblemente alrededor de -40 a -50 °C, tal como alrededor de -45 °C.

En determinadas modalidades, la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa se somete a la etapa de congelación b) del método tal como se describió en los párrafos anteriores en recipientes, tales como viales, cada uno de los cuales comprende múltiples (por ejemplo, cinco) dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue. En determinadas modalidades de ese

tipo, la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa se somete a la etapa de congelación b) en un volumen que es menor que el volumen usado para reconstituir las cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada. En determinadas modalidades preferidas, el volumen de la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que se somete a la etapa de congelación b) es aproximadamente la mitad del volumen usado para reconstituir la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada.

En determinadas otras modalidades, la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa se somete a la etapa de congelación b) del método tal como se describió en los párrafos anteriores en recipientes, tales como viales, cada uno de los cuales comprende una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue. En determinadas modalidades de ese tipo, la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa se somete a la etapa de congelación b) en un volumen que es menor que el volumen usado para reconstituir la dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada. En determinadas modalidades preferidas, el volumen de la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que se somete a la etapa de congelación b) es aproximadamente la mitad del volumen usado para reconstituir la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada.

En una modalidad, la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa utilizada en el método de secado descrito en los párrafos anteriores comprende:

alrededor de 9 a 11 % p/v, tal como alrededor de 10 % p/v de trehalosa,
alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v, tal como alrededor de 0.3 % p/v de poloxámero,
alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v, tal como alrededor de 0.3 % p/v de urea,
alrededor de 0.2 a 0.3 % p/v, tal como alrededor de 0.25 % p/v de clorhidrato de arginina,
alrededor de 0.05 a 0.15 % p/v, tal como alrededor de 0.1 % p/v de trometamina, y
alrededor de 0.05 a 0.15 % p/v, tal como alrededor de 0.1 % p/v de seroalbúmina humana.

En una modalidad, la etapa de secado primario (c) en el método tal como se describió en los párrafos anteriores se lleva a cabo en un aparato con una temperatura de almacenamiento de -31 °C a -19 °C, o de alrededor de -31 a -21 °C, preferiblemente alrededor de -29 a -25 °C, tal como alrededor de -27 °C y opcionalmente a una presión de menos de 0.05 mbar, preferiblemente de alrededor de 0.01 a menos de 0.05 mbar, o de alrededor de 0.04 mbar. En determinadas modalidades de ese tipo, la etapa de secado primario (c) se lleva a cabo durante un período de alrededor de 20 a 120 horas, preferiblemente alrededor de 30 a 100 horas, más preferiblemente alrededor de 40 a 70 horas, o alrededor de 50 a 70 horas.

En una modalidad preferida, la etapa de secado primario (c) en el método tal como se describió en los párrafos anteriores se lleva a cabo en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de -31 °C a -21 °C, tal como alrededor de -27 °C o alrededor de -24°C y a una presión de

menos de 0.05 mbar, preferiblemente de alrededor de 0.01 a menos de 0.05 mbar, tal como de alrededor de 0.03 mbar.

En una modalidad, la etapa de secado secundario (d) se lleva a cabo en un aparato con una temperatura de almacenamiento de al menos 15 °C, o al menos 20 °C, o de alrededor de 15 a 40 °C, o de alrededor de 20 a 40 °C, o alrededor de 25 °C y opcionalmente a una presión de menos de 0.5 mbar, preferiblemente de alrededor de 0.1 a menos de 0.4 mbar, o de alrededor de 0.3 mbar. En determinadas modalidades de ese tipo, la etapa de secado secundario (d) se lleva a cabo durante un período de alrededor de 1 a 15 horas, preferiblemente alrededor de 3 a 10 horas, más preferiblemente alrededor de 6 a 10 horas, o alrededor de 7 a 9 horas.

En una modalidad preferida, la etapa de secado secundario (d) se lleva a cabo en un aparato con una temperatura de almacenamiento de al menos 15 °C, tal como 25 °C, y a una presión de menos de 0.05 mbar, preferiblemente de alrededor de 0.01 a menos de 0.04 mbar, tal como alrededor de 0.03 mbar.

En una modalidad preferida, se usa la misma presión en la etapa de secado primario y en la etapa de secado secundario. En determinadas modalidades de ese tipo, la presión en la etapa de secado primario y la etapa de secado secundario es de alrededor de 0.025 mbar a 0.035 mbar tal como alrededor de 0.030 mbar.

En una modalidad, la etapa de secado primario y secundario en el método tal como se describió en los párrafos anteriores se lleva a cabo durante un período de menos de 160 horas, preferiblemente alrededor de 50 a 120 horas, más preferiblemente de alrededor de 50 a menos de 100 horas, o alrededor de 60 a 90 horas.

En una modalidad preferida, las etapas b), c) y d) del método de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada tal como se describió en los párrafos anteriores se lleva a cabo durante un período de menos de 120 horas, preferiblemente alrededor de 50 a menos de 100 horas, más preferiblemente alrededor de 40 a menos de 90 horas.

En una modalidad, el producto secado primario en el método tal como se describió en los párrafos anteriores tiene un contenido de humedad residual de alrededor de 5 a 10 % p/p, o menos de 10 % p/p tal como se determina mediante determinación de Karl Fischer. En una modalidad, el producto secado secundario tiene un contenido de humedad residual de no más de 3.0 % p/p, o de alrededor de 0.01 a 2 % p/p, preferiblemente menos de 2 % p/p, más preferiblemente menos de 1 % p/p tal como se determina mediante determinación de Karl Fischer.

Métodos de prevención y usos

La presente invención está dirigida en parte a un método de prevención de la enfermedad del dengue

(en particular, dengue confirmable virológicamente, VCD) en un sujeto. Por lo tanto, en determinadas modalidades la invención está dirigida a un método de prevención de la enfermedad del dengue en un sujeto, que comprende administrar al sujeto una dosis unitaria, en particular una dosis unitaria reconstituida, de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento, por ejemplo, mediante inyección subcutánea o administración intramuscular.

En particular, la presente invención está dirigida en parte a un método de prevención de la enfermedad del dengue en un sujeto que comprende administrar una vacunación primaria solamente con dos administraciones de una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento que comprenden las siguientes etapas: administrar una primera dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto, y administrar una segunda dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto en los 3 meses posteriores a la administración de la primera dosis unitaria, y opcionalmente administrar una dosis de refuerzo al menos 12 meses después de la administración de dicha segunda dosis unitaria de la vacuna contra el dengue.

La presente invención está dirigida además en parte a una formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento para el uso en un método de prevención de la enfermedad del dengue (en particular, dengue confirmable virológicamente, VCD) en un sujeto. Por lo tanto, en determinadas modalidades la invención está dirigida a una formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento para el uso en un método de prevención de la enfermedad del dengue en un sujeto, donde el método comprende administrar al sujeto una dosis unitaria, en particular una dosis unitaria reconstituida, de la formulación de vacuna contra el dengue, por ejemplo, mediante inyección subcutánea o administración intramuscular.

En particular, la presente invención está dirigida en parte a una formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento para el uso en un método de prevención de la enfermedad del dengue en un sujeto, donde el método comprende administrar una vacunación primaria solamente con dos administraciones de una dosis unitaria que comprenden las siguientes etapas: administrar una primera dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto, y administrar una segunda dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto, por ejemplo, en los 3 meses posteriores a la administración de la primera dosis unitaria, y opcionalmente administrar una dosis de refuerzo al menos 12 meses después de la administración de dicha segunda dosis unitaria de la vacuna contra el dengue.

La presente invención está dirigida además en parte a un uso de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento para prevenir la enfermedad del dengue (en particular, dengue confirmable virológicamente, VCD) en un sujeto. Por lo tanto, en determinadas modalidades, la invención está dirigida a un uso de la

formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento para prevenir la enfermedad del dengue en un sujeto mediante la administración de una dosis unitaria, en particular una dosis unitaria reconstituida, de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto, por ejemplo, mediante inyección subcutánea o administración intramuscular.

En particular, la presente invención está dirigida en parte a un uso de la formulación de vacuna contra el dengue tal como se describe en el presente documento para la fabricación de un medicamento para prevenir la enfermedad del dengue en un sujeto mediante la administración de una vacunación primaria solamente con dos administraciones de una dosis unitaria que comprende la administración de una primera dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto, y la administración de una segunda dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto, por ejemplo, en los 3 meses posteriores a la administración de la primera dosis unitaria, y opcionalmente la administración de una dosis de refuerzo al menos 12 meses después de la administración de dicha segunda dosis unitaria de la vacuna contra el dengue.

EJEMPLOS

Los ejemplos que siguen se incluyen para mostrar determinados aspectos y modalidades de la invención tal como se describirá en las reivindicaciones. Sin embargo, las personas expertas en la técnica deberían darse cuenta de que la siguiente descripción es solamente ilustrativa y no debe tomarse de ninguna manera como una restricción de la invención. Las concentraciones y cantidades que se dan en las siguientes tablas se redondean, por ejemplo, a tres dígitos significativos.

Preparación de las cepas del virus del dengue y la composición del virus del dengue tetravalente

Los métodos utilizados para generar las cepas quiméricas de dengue TDV-1, -3 y -4 fueron métodos convencionales de ingeniería de ADN y clonación molecular y se describen en Huang et al. (2003) J. Virology 77(21): 11436-11447. Se utilizaron los siguientes métodos muy conocidos para construir e introducir los genes prM-E de los serotipos 1, 3 y 4 del dengue en la estructura principal de TDV-2: PCR con retrotranscriptasa (RT-PCR), PCR, digestión con enzimas de restricción, ligación de fragmentos de ADN, transformaciones bacterianas mediante electroporación, preparaciones de ADN plasmídico, transcripción *in vitro* mediante ARN polimerasa T7 y transfección de células Vero mediante electroporación. El cultivo y la purificación de los diferentes serotipos de dengue se llevaron a cabo tal como se describe en Huang et al. (2013) PLOS Neglected Dis, 7(5):e2243.

Las cepas quiméricas del dengue TDV-1, -3 y -4 se combinaron con TDV-2 para formar una composición de virus del dengue tetravalente en las concentraciones descritas en el presente documento.

EJEMPLO 1

Preparación de la formulación de la vacuna contra el dengue en forma acuosa

La composición de virus del dengue tetravalente se combinó con excipientes farmacéuticamente aceptables, lo que dio como resultado una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que comprendía las concentraciones de excipientes que se mostrarán en la Tabla 5.

Tabla 5. Aportes de excipientes a la formulación de la vacuna contra el dengue en forma acuosa antes de la liofilización.

Componente	g/L	%(p/v)
α,α -trehalosa, dihidrato	100	10
Kolliphor® P407 (Pluronic® F-127, BioReagent, Poloxámero 407)	3	0.3
Seroalbúmina humana	1	0.1
Clorhidrato de L-arginina	2.5	0.25
Urea	3.0	0.3
Trometamina	1.2	0.12
Dihidrogenofosfato de potasio	0.04	0.004
Hidrogenofosfato disódico, dihidrato	0.35	0.035
Cloruro de potasio	0.03	0.003
Cloruro de sodio	2.2	0.22
Ácido clorhídrico (HCl a 1 M, ajuste del pH hasta pH 7.4 ± 0.2)		

Preparación de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca

Para el suministro de cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue, se liofilizaron 1.65 mL de la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa en un vial de acuerdo con el proceso que se mostrará en la Tabla 6.

Tabla 6. Etapas del ciclo de liofilización.

	Etapas	Parámetro	Objetivo (temperatura de almacenamiento/presión de la cámara)	Real (temperatura de almacenamiento/presión de la cámara)
5	Carga	Temp. (°C)	5	De 6.2 a 6.7
		Hora (hh:mm)	00:30	00:30
		Presión (µm Hg)	<ATM	<ATM
10	Tasa de congelación	Tasa (°C/tiempo)	0.5/min	0.5/min
		Tiempo total (hh:mm)	1:20	n/a
		Presión (µm Hg)	<ATM	<ATM
15	Retención de congelación	Temp. (°C)	-45	De -43.7 a -43.1
		Hora (hh:mm)	01:00	01:00
		Presión (µm Hg)	<ATM	<ATM
20	Rampa de secado primario	Tasa (°C/tiempo)	0.5/min	0.5/min
		Tiempo total (hh:mm)	0:36	0:36
		Presión (µm Hg)	30 ± 10	30 ± 10
25	Retención de secado primario	Temp. (°C)	-27	De -26.0 a -25.3
		Hora (hh:mm)	65:00	65:00
		Presión (µm Hg)	30 ± 10	De 33 a 34
30	Rampa de secado secundario	Tasa (°C/tiempo)	0.1/min	0.1/min
		Tiempo total (hh:mm)	08:40	n/a
35				

	Presión (µm Hg)	250 ± 10	250 ± 10
Retención de secado secundario	Temp. (°C)	25	De 25.7 a 26.3
	Hora (hh:mm)	8:00	8:00
	Presión (µm Hg)	250 ± 10	De 247 a 247
	Tiempo total (hh:mm) en escala de producción	<100:00	<100:00

La composición de excipientes de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada se mostrará en la Tabla 7. El contenido de humedad residual determinado mediante determinación de Karl Fischer fue del 0.58 % p/p.

Tabla 7. Composición de excipientes de la formulación de la vacuna contra el dengue en forma seca.

Componente	mg/vial	% (p/p)
α,α-trehalosa	149.3	87.0
Kolliphor® P407 (Pluronic® F-127, BioReagent, Poloxámero 407)	4.95	2.9
Seroalbúmina humana	1.65	0.96
Clorhidrato de L-arginina	4.1	2.4
Urea	4.95	2.9
Trometamina	2.0	1.2
Dihidrogenofosfato de potasio	0.06	0.03
Hidrogenofosfato disódico	0.47	0.3
Cloruro de potasio	0.05	0.03
Cloruro de sodio	3.59	2.1
Ácido clorhídrico	0.48	0.3
Total	171.7	100

Las características de la torta de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada se resumirán en la Tabla 8.

Tabla 8. Características de la torta de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada.

Color	Blanco
Estructura	Densa
Dimensión	Altura del relleno: 8 mm, altura de la torta: 5-6 mm y contracción uniforme de alrededor de 1 mm
Topografía	Cóncava y texturizada
Finalizar	Arriba: brillo; lados y fondo: mate
Inversión de friabilidad	La torta permaneció intacta y en el fondo del vial
Friabilidad discordante	La torta cayó a la parte superior del vial con algo de polvo y fragmentos desprendiéndose
Material residual	Espesor variable, película blanca a la altura de relleno original

Cuando la torta, es decir, la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada, se reconstituyó con 3.25 mL de una solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM, el aspecto después de 70 segundos era transparente e incoloro con un anillo de burbujas en la superficie. El pH observado fue de 7.6 de acuerdo con el método de evaluación USP <791> para mediciones de pH de la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos. La osmolalidad observada fue de alrededor de 300 mOsmol/kg, de acuerdo con el método de evaluación USP <785> para las mediciones de osmolalidad de la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos. Las concentraciones de excipientes en la formulación de vacuna reconstituida contra el dengue se mostrarán en la Tabla 9.

Tabla 9. Composición de excipientes de la formulación de la vacuna contra el dengue en forma acuosa después de la reconstitución.

Componente	g/L	%(p/v)	mg/dosis unitaria de 0.5 mL
α,α -trehalosa	45.95	4.6	22.97
Kolliphor® P407 (Pluronic® F-127, BioReagent, Poloxámero 407)	1.52	0.15	0.76
Seroalbúmina humana	0.51	0.05	0.25
Clorhidrato de L-arginina	1.3	0.13	0.63
Urea	1.52	0.15	0.76

Trometamina	0.61	0.06	0.31
Dihidrogenofosfato de potasio	0.02	0.002	0.01
Hidrogenofosfato disódico	0.14	0.014	0.07
Cloruro de potasio	0.02	0.002	0.01
Cloruro de sodio	3.27	0.33	1.64
Ácido clorhídrico	0.15	0.015	0.07

EJEMPLO 2

Mediante el uso del proceso descrito en el Ejemplo 1, se preparó una formulación de vacuna contra el dengue que contenía trometamina a 10 mM (0.12 % p/v) antes de la liofilización mediante el uso de una combinación de trometamina y clorhidrato de trometamina (Tris-HCl). La composición de excipientes de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada se mostrará en la Tabla 10.

Tabla 10. Composición de excipientes de la formulación de la vacuna contra el dengue en forma seca.

Componente	mg/vial	% (p/p)
Urea	5.0	2.88
Clorhidrato de L-arginina	4.1	2.40
Cloruro de sodio	3.59	2.09
Trometamina	0.33	0.19
Tris-HCl	2.17	1.27
α,α -trehalosa	149.3	86.98
Seroalbúmina humana	1.65	0.96
Dihidrogenofosfato de potasio	0.06	0.04
Hidrogenofosfato disódico	0.47	0.27
Cloruro de potasio	0.05	0.03
Pluronic® F-127	4.95	2.88
Total	171.7	100.00

Como se describe en el Ejemplo 1, un vial contiene cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue. En el momento de la administración, el vial se reconstituye con el contenido completo de un vial o jeringa precargada de diluyente (p. ej. solución de cloruro de sodio a 37 mM) de forma tal que puedan extraerse y administrarse cinco dosis de vacuna de 0.5 mL.

Después de reconstituir el vial con 3.38 mL de solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM hasta un volumen de alrededor de 3.49 mL, una dosis de 0.5 mL contiene, por ejemplo, alrededor de 0.47 g/L de seroalbúmina humana (1.65 mg/vial : 3.49 mL), o alrededor de 0.24 mg de seroalbúmina humana (0.47 g/L x 0.5 mL), respectivamente.

EJEMPLO 3

Preparación de la formulación de la vacuna contra el dengue en forma acuosa

La composición de virus del dengue tetravalente tal como se describe en el presente documento se combinó con excipientes farmacéuticamente aceptables, lo que dio como resultado una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que comprende las concentraciones de excipiente que se mostrarán en la Tabla 11.

Tabla 11. Aportes de excipientes a la formulación de la vacuna contra el dengue en forma acuosa antes de la liofilización.

Componente	g/L	%(p/v)
α,α -Trehalosa, dihidrato	100.00	10
Kolliphor® P407 (Pluronic® F-127, BioReagent, Poloxámero 407)	3.00	0.3
Seroalbúmina humana	1.00	0.1
Clorhidrato de L-Arginina	2.50	0.25
Urea	3.00	0.3
Trometamina	1.20	0.12
Dihidrogenofosfato de potasio	0.04	0.004
Hidrogenofosfato disódico, dihidrato	0.29	0.029
Cloruro de potasio	0.03	0.003
Cloruro de sodio	2.17	0.22
Ácido clorhídrico (HCl a 1 M, ajuste del pH hasta pH 7.4 $\pm$ 0.2)		

Preparación de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca

Para el suministro de cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue, se liofilizaron 1.65 mL de la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa en un vial de acuerdo con el proceso que se mostrará en la Tabla 12. Una vez finalizada satisfactoriamente la prueba de aumento de presión, se aumenta la presión de la cámara a 700 mbar para taponar utilizando nitrógeno seco (N₂). La temperatura de almacenamiento se disminuye hasta 5 °C en

preparación para taponar. El tiempo total de liofilización desde el equilibrado a 5°C hasta el taponado es de aproximadamente 72 horas.

Tabla 12. Parámetros de liofilización.

Carga de temperatura de almacenamiento		+5 °C
Congelación	Rampa	0.5 °C/min
	Tiempo	01:40
	Temperatura final	-45 °C
	Presión de la cámara	Atmósfera
	Tiempo de espera	02:20
Primario	Rampa	0.5 °C/min
	Tiempo	00:42
	Temperatura final	-24 °C
	Presión de la cámara	0.030 mbar
	Tiempo de espera	55:00
Secundario	Rampa	0.1 °C/min
	Tiempo	08:10
	Temperatura final	+25 °C
	Presión de la cámara	0.030 mbar
	Tiempo de espera	08:00
Temperatura de almacenamiento		+5 °C
Presión de la cámara después del secado		700 mbar
El tiempo se indica en (hh:mm)		

La composición de excipientes de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada se mostrará en la Tabla 13.

Tabla 13. Composición de excipientes de la formulación de la vacuna contra el dengue en forma seca.

Componente	mg/vial	% (p/p)
α,α-Trehalosa	149.28	87.03
Kolliphor® P407 (Pluronic® F-127, BioReagent, Poloxámero 407)	4.95	2.89
Seroalbúmina humana	1.65	0.96

Clorhidrato de L-Arginina	4.12	2.40
Urea	4.95	2.9
Trometamina	2.0	1.2
Dihidrogenofosfato de potasio	0.06	0.03
Hidrogenofosfato disódico, dihidrato	0.38	0.22
Cloruro de potasio	0.05	0.03
Cloruro de sodio	3.59	2.1
Ácido clorhídrico	0.48	0.3
Total	171.6	100

Las concentraciones de excipiente en la formulación de vacuna contra el dengue reconstituida después de la reconstitución con 3.38 mL de solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM hasta un volumen de alrededor de 3.49 mL se mostrarán en la Tabla 14.

Tabla 14. Composición de excipientes de la formulación de la vacuna contra el dengue en forma acuosa después de la reconstitución.

Componente	g/L	%(p/v)	mg/dosis unitaria de 0.5 mL
α,α -Trehalosa	42.77	4.3	21.39
Kolliphor® P407 (Pluronic® F-127, BioReagent, Poloxámero 407)	1.42	0.14	0.71
Seroalbúmina humana	0.47	0.05	0.24
Clorhidrato de L-Arginina	1.18	0.12	0.59
Urea	1.42	0.14	0.71
Trometamina	0.57	0.06	0.29
Dihidrogenofosfato de potasio	0.02	0.002	0.01
Hidrogenofosfato disódico, dihidrato	0.11	0.011	0.05
Cloruro de potasio	0.02	0.002	0.01
Cloruro de sodio	3.12	0.31	1.56
Ácido clorhídrico	0.14	0.014	0.07

Los atributos fisicoquímicos de la formulación de vacuna contra el dengue se resumirán en la Tabla 15.

Tabla 15. Atributos fisicoquímicos de la formulación de vacuna contra el dengue

pH (USP <791> Ph. Eur. 2.2.3)	7.4
Humedad residual (Karl Fischer) (USP <921> Ph. Eur. 2.5.32)	≤3.0 %
Aspecto Método Visual (lío­filizada)	Torta compacta de color blanco a blanquecino
Tiempo de resuspensión	≤60 segundos
Aspecto Método Visual (Líquido reconstituido)	Solución transparente, incolora a marillo pálido, esencialmente libre de partículas extrañas

EJEMPLO 4

Mediante el uso del proceso descrito en el Ejemplo 3, se preparó una formulación de vacuna contra el dengue que contenía trometamina a 10 mM (0.12 % p/v) antes de la liofilización mediante el uso de una combinación de trometamina y clorhidrato de trometamina (Tris-HCl). Las concentraciones de excipiente en la formulación de vacuna contra el dengue antes de la liofilización se mostrarán en la Tabla 16.

Tabla 16. Aportes de excipientes a la formulación de la vacuna contra el dengue en forma acuosa antes de la liofilización.

Componente	g/L	%(p/v)
α,α-Trehalosa, dihidrato	100.00	10.00
Kolliphor® P407 (Pluronic® F-127, BioReagent, Poloxámero 407)	3.00	0.30
Seroalbúmina humana	1.00	0.10
Clorhidrato de L-Arginina	2.50	0.25
Urea	3.00	0.30
Trometamina (Tris)	0.20	0.02
Tris-HCl	1.32	0.13

Dihidrogenofosfato de potasio	0.04	0.004
Hidrogenofosfato disódico, dihidrato	0.28	0.028
Cloruro de potasio	0.03	0.003
Cloruro de sodio	2.17	0.22

Para el suministro de cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue, se liofilizaron 1.65 mL de la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa en un vial. El tiempo total el ciclo de liofilización fue de aproximadamente 77 horas. La composición de excipientes de la formulación de vacuna contra el dengue se mostrará en la Tabla 17.

Tabla 17. Composición de excipientes de la formulación de la vacuna contra el dengue en forma seca.

Componente	mg/vial	% (p/p)
Urea	4.95	2.89
Clorhidrato de L-Arginina	4.12	2.40
Cloruro de sodio	3.59	2.09
Trometamina	0.33	0.19
Tris-HCl	2.17	1.27
α,α -Trehalosa	149.28	87.03
Seroalbúmina humana	1.65	0.96
Dihidrogenofosfato de potasio	0.06	0.04
Hidrogenofosfato disódico	0.37	0.22
Cloruro de potasio	0.05	0.03
Pluronic® F-127	4.95	2.89
Total	171.5	100.00

Las concentraciones de excipiente en la formulación de vacuna contra el dengue reconstituida después de la reconstitución con 3.38 mL de solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM hasta un volumen de alrededor de 3.49 mL se mostrarán en la Tabla 18.

Tabla 18. Composición de excipientes de la formulación de la vacuna contra el dengue en forma acuosa después de la reconstitución.

Componente	g/L	%(p/v)
Urea	1.42	0.14
Clorhidrato de L-Arginina	1.18	0.12
Cloruro de sodio	3.12 ^a	0.31 ^a
Trometamina	0.09	0.01
Tris-HCl	0.62	0.06
α,α -Trehalosa	42.77	4.28
Seroalbúmina humana	0.47	0.05
Dihidrogenofosfato de potasio	0.02	0.002
Hidrogenofosfato disódico	0.11	0.01
Cloruro de potasio	0.02	0.002
Pluronic® F-127	1.42	0.14
<i>(a) Incluye aporte de la formulación liofilizafa y diluyente cloruro de sodio a 37 mM.</i>		

Para el suministro de una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue, se liofilizaron 0.33 mL de la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa en un vial. El tiempo total el ciclo de liofilización fue de aproximadamente 49 horas. La composición de excipientes de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada se mostrará en la Tabla 19.

Tabla 19. Composición de excipientes de la formulación de la vacuna contra el dengue en forma seca.

Componente	mg/vial	% (p/p)
Urea	0.99	2.89
Clorhidrato de L-Arginina	0.82	2.40
Cloruro de sodio	0.72	2.09
Trometamina	0.07	0.19
Tris-HCl	0.43	1.27
α,α -Trehalosa	29.86	87.03
Seroalbúmina humana	0.33	0.96
Dihidrogenofosfato de potasio	0.01	0.04
Hidrogenofosfato disódico	0.07	0.22
Cloruro de potasio	0.01	0.03
Pluronic® F-127	0.99	2.89

Total	34.3	100.00
-------	------	--------

Las concentraciones de excipiente en la formulación de vacuna contra el dengue reconstituida después de la reconstitución con 0.68 mL de solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM hasta un volumen de alrededor de 0.70 mL se mostrarán en la Tabla 20.

Tabla 20. Composición de excipientes de la formulación de la vacuna contra el dengue en forma acuosa después de la reconstitución.

Componente	g/L	%(p/v)	mg/dosis unitaria de 0.5 mL
Urea	1.41	0.14	0.71
Clorhidrato de L-Arginina	1.18	0.12	0.59
Cloruro de sodio	3.12 ^a	0.31 ^a	1.56
Trometamina	0.09	0.01	0.05
Tris-HCl	0.62	0.06	0.31
α,α -Trehalosa	42.65	4.27	21.33
Seroalbúmina humana	0.47	0.05	0.24
Dihidrogenofosfato de potasio	0.02	0.002	0.01
Hidrogenofosfato disódico	0.11	0.01	0.05
Cloruro de potasio	0.02	0.002	0.01
Pluronic® F-127	1.41	0.14	0.71
<i>(a) Incluye aporte de la formulación liofilizada y diluyente cloruro de sodio a 37 mM.</i>			

La composición de la formulación de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el Ejemplo 4 se mostrará en la Tabla 21. Los atributos fisicoquímicos de la formulación de vacuna contra el dengue corresponden a los descritos en la Tabla 15 anterior.

Tabla 21. Composición de la formulación de vacuna contra el dengue.

Ingredientes		Cantidad por dosis ^b
Activo ^a	Serotipo TDV-1	$\geq 3.3 \log_{10}$ UFP/dosis
	Serotipo TDV-2	$\geq 2.7 \log_{10}$ UFP/dosis
	Serotipo TDV-3	$\geq 4.0 \log_{10}$ UFP/dosis
	Serotipo TDV-4	$\geq 4.5 \log_{10}$ UFP/dosis
Excipientes	α,α -Trehalosa, dihidrato	23.64 mg/dosis

5 10	Kolliphor® P407 (F-127)	0.71 mg/dosis
	Seroalbúmina humana	0.24 mg/dosis
	Dihidrogenofosfato de potasio	0.07 µmoles/dosis
	Hidrogenofosfato disódico dihidrato	0.38 µmoles/dosis
	Trometamina	0.39 µmoles/dosis
	Tris HCl	1.97 µmoles/dosis
	L-Arginina HCl	2.81 µmoles/dosis
	Urea	11.81 µmoles/dosis
	Cloruro de potasio	0.10 µmoles/dosis
	Cloruro de sodio	26.66 µmoles/dosis ^c
(a) Se hace referencia a las cuatro sustancias medicinales monovalentes de la vacuna contra el dengue tetravalente como TDV. Las concentraciones enumeradas se alinean con el intervalo de especificación al Final de la Vida Útil (ESL) para el producto aprobado «Qdenga», la ESL aprobada actual para TDV2 es $\geq 3.1 \log_{10}$ UFP/dosis para Indonesia. (b) El volumen de dosis administrada es 0.5 mL. (c) Incluye aporte de la formulación liofilizafa y diluyente cloruro de sodio a 37 mM.		

EJEMPLO COMPARATIVO

Preparación de la formulación de control del virus del dengue en forma acuosa

La composición de virus del dengue tetravalente se combinó con una composición de excipientes farmacéuticamente aceptables, lo que dio como resultado una formulación de control de vacuna contra el dengue («control») en forma acuosa que comprendía las concentraciones de excipientes que se mostrarán en la Tabla 22.

Tabla 22. Aportes de excipientes a la formulación de control de la vacuna contra el dengue en forma acuosa antes de la liofilización.

Componente	g/L	%(p/v)
α,α-trehalosa, dihidrato	165.8	16.58
Kolliphor® P407 (Pluronic® F-127, BioReagent, Poloxámero 407)	10	1
Seroalbúmina humana	1	0.1

Dihidrogenofosfato de potasio	0.24	0.02
Hidrogenofosfato disódico, dihidrato	1.78	0.18
Cloruro de potasio	0.2	0.02
Cloruro de sodio	5.8	0.58

Preparación de la formulación de control del virus del dengue en forma seca

Para el suministro de cinco dosis unitarias de la formulación de control de vacuna contra el dengue, se liofilizaron 3.25 mL de la formulación de control de vacuna contra el dengue en forma acuosa en un vial de acuerdo con el proceso que se mostrará en la Tabla 23.

Tabla 23. Etapas del ciclo de liofilización.

Etapas	Parámetro	Objetivo (temperatura de almacenamiento/presión de la cámara)	Real (temperatura de almacenamiento/presión de la cámara)
Carga	Temp. (°C)	5	De 6.2 a 6.7
	Hora (hh:mm)	00:30	00:30
	Presión (µm Hg)	<ATM	<ATM
Tasa de congelación	Tasa (°C/tiempo)	0.5/min	0.5/min
	Tiempo total (hh:mm)	1:20	n/a
	Presión (µm Hg)	<ATM	<ATM
Retención de congelación	Temp. (°C)	-45	De -43.7 a -43.1
	Hora (hh:mm)	01:00	01:00
	Presión (µm Hg)	<ATM	<ATM
Rampa de secado primario	Tasa (°C/tiempo)	0.5/min	0.5/min
	Tiempo total	0:36	0:36

	(hh:mm)		
	Presión (µm Hg)	30 ± 10	30 ± 10
Retención de secado primario	Temp. (°C)	-27	De -26.0 a -25.3
	Hora (hh:mm)	136:00	136:00
	Presión (µm Hg)	30 ± 10	De 33 a 34
Rampa de secado secundario	Tasa (°C/tiempo)	0.1/min	0.1/min
	Tiempo total (hh:mm)	08:40	n/a
	Presión (µm Hg)	250 ± 10	250 ± 10
Retención de secado secundario	Temp. (°C)	25	De 25.7 a 26.3
	Hora (hh:mm)	10:00	10:00
	Presión (µm Hg)	250 ± 10	De 247 a 247
	Tiempo total (hh:mm) en escala de producción	alrededor de 160:00	alrededor de 160:00

La composición de excipientes de la formulación de control de vacuna contra el dengue liofilizada se mostrará en la Tabla 24. El contenido de humedad residual era de 0.77 % p/p tal como se determinó mediante determinación de Karl Fischer.

Tabla 24. Composición de excipientes de la formulación de control de vacuna contra el dengue en forma seca.

Componente	% (p/p)
α,α-trehalosa	88.9
Kolliphor® P407 (Pluronic® F-127, BioReagent,	5.9

Poloxámero 407)	
Seroalbúmina humana	0.6
Dihidrogenofosfato de potasio	0.1
Hidrogenofosfato disódico	0.8
Cloruro de potasio	0.1
Cloruro de sodio	3.4
Total	100

Las características de la torta de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada se resumirán en la Tabla 25.

Tabla 25. Características de la torta de la formulación de control de vacuna contra el dengue liofilizada.

Color	Blanco
Estructura	Densa
Dimensión	Altura del relleno: 12-13 mm, altura de la torta: 11-12 mm y contracción uniforme de alrededor de 1 mm
Topografía	Cóncava con grietas, texturizada con astillas en el borde
Finalizar	Arriba: brillo; lados y fondo: mate
Inversión de friabilidad	La torta permaneció intacta y se movió ligeramente en el vial
Friabilidad discordante	La torta cayó a la parte superior del vial con algo de polvo y fragmentos desprendiéndose
Material residual	Película blanca gruesa en la altura de relleno original y donde estaba asentada la torta

Cuando la torta, es decir, la formulación de control de vacuna contra el dengue liofilizada, se reconstituyó con 3.25 mL de una solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM, el aspecto después de 20 segundos era transparente e incoloro con un anillo de burbujas en la superficie. El pH observado fue de 7.6 de acuerdo con el método de evaluación USP <791> para mediciones de pH de la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos. La osmolalidad observada fue de alrededor de 800 mOsmol/kg de acuerdo con el método de evaluación USP <785> para las mediciones de osmolalidad de la Convención de la Farmacopea de los Estados Unidos. Las concentraciones de excipientes en la formulación de control reconstituida se mostrarán en la

Tabla 26.

Tabla 26. Composición de excipientes de la formulación de control de la vacuna contra el dengue en forma acuosa después de la reconstitución.

Componente	g/L	%(p/v)	mg/dosis unitaria de 0.5 mL
α,α -trehalosa	150	15.0	75
Kolliphor® P407 (Pluronic® F-127, BioReagent, Poloxámero 407)	10	1	5
Seroalbúmina humana	1	0.1	0.5
Dihidrogenofosfato de potasio	0.2	0.02	0.12
Hidrogenofosfato disódico	1.4	0.01	0.71
Cloruro de potasio	0.2	0.02	0.1
Cloruro de sodio	8	0.8	4

Tabla 27. Comparación de la composición de excipientes de las formulaciones de la vacuna contra el dengue de acuerdo con los Ejemplos 1 a 4 y la formulación de control de la vacuna contra el dengue en forma acuosa después de la reconstitución.

Componente	mg/dosis unitaria de 0.5 mL			
	Formulación de acdo. con el Ejemplo 1	Formulación de control	Formulación de acdo. con el Ejemplo 3	Formulación de acdo. con el Ejemplo 4
α,α -trehalosa	23	75	21.39	21.39
Kolliphor® P407 (Pluronic® F-127, BioReagent, Poloxámero 407)	0.76	5	0.71	0.71
Seroalbúmina humana	0.25	0.5	0.24	0.24
Clorhidrato de L-arginina	0.63	-	0.59	0.59
Urea	0.76	-	0.71	0.71
Trometamina	0.31	-	0.29	0.05
Dihidrogenofosfato de potasio	0.01	0.12	0.01	0.01
Hidrogenofosfato disódico	0.07	0.71	0.05	0.05
Cloruro de potasio	0.01	0.1	0.01	0.01

Cloruro de sodio	1.64	4	1.56	1.56
Ácido clorhídrico	0.07	-	0.07	-
Tris HCl	-	-	-	0.31

Tabla 28. Comparación de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con el Ejemplo 4 y la formulación de control de la vacuna contra el dengue.

Ingredientes		Cantidad por Dosis ^b	
		Ejemplo 4	Control
Activo ^a	Serotipo TDV-1	$\geq 3.3 \log_{10}$ UFP/dosis	$\geq 3.3 \log_{10}$ UFP/dosis
	Serotipo TDV-2	$\geq 2.7 \log_{10}$ UFP/dosis	$\geq 2.7 \log_{10}$ UFP/dosis
	Serotipo TDV-3	$\geq 4.0 \log_{10}$ UFP/dosis	$\geq 4.0 \log_{10}$ UFP/dosis
	Serotipo TDV-4	$\geq 4.5 \log_{10}$ UFP/dosis	$\geq 4.5 \log_{10}$ UFP/dosis
Excipientes	α, α -Trehalosa, dihidrato	23.64 mg/dosis	82.9 mg/dosis
	Kolliphor® P407 (F-127)	0.71 mg/dosis	5.0 mg/dosi
	Seroalbúmina humana	0.24 mg/dosis	0.5 mg/dosis
	Dihidrogenofosfato de potasio	0.07 μ moles/dosis	0.88 μ moles/dosis
	Hidrogenofosfato disódico dihidrato	0.38 μ moles/dosis	5.01 μ moles/dosis
	Trometamina	0.39 μ moles/dosis	-
	Tris HCl	1.97 μ moles/dosis	-
	L-Arginina HCl	2.81 μ moles/dosis	-
	Urea	11.81 μ moles/dosis	-
	Cloruro de potasio	0.10 μ moles/dosis	1.35 μ moles/dosis
	Cloruro de sodio	26.66 μ moles/dosis ^c	68.5 μ moles/dosis ^c
(a) Se hace referencia a las cuatro sustancias medicinales monovalentes de la vacuna contra el dengue tetravalente como TDV. Las concentraciones enumeradas se alinean con el intervalo de especificación al Final de la Vida Útil (ESL) para el producto aprobado «Qdenga», la ESL aprobada actual para TDV2 es $\geq 3.1 \log_{10}$ UFP/dosis para Indonesia. (b) El volumen de dosis administrada es 0.5 mL. (c) Incluye aporte de la formulación liofilizafa y diluyente cloruro de sodio a 37 mM.			

MEDICIONES DE ESTABILIDAD

Las concentraciones de virus se determinan mediante un ensayo de enfoque inmunitario que da como resultado unidades formadoras de placa (ufp). En un ejemplo, el ensayo de foco inmunitario se lleva a cabo tal como se describe en detalle en la sección 2.5 de Brewo et al. (Vaccine. 14 de febrero de 2012; 30(8): 1513–1520. doi:10.1016/j.vaccine.2011.11.072.). Cada muestra se midió por triplicado y los resultados se informaron como un promedio de los valores.

Pérdida de liofilización

Se determinó la pérdida log₁₀ en la potencia del virus a causa de la liofilización para la formulación de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el Ejemplo 1 y la formulación de control de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el ejemplo comparativo. Los resultados se mostrarán en la Tabla 29.

Tabla 29. Pérdida log₁₀ en el valor de virus a causa de la liofilización.

	TDV-1	TDV-2	TDV-3	TDV-4
Pérdida de liofilización Formulación de control	-0.46	-0.33	-0.40	-0.33
Pérdida de liofilización Formulación de acdo. con el Ej. 1	-0.20	-0.11	-0.31	-0.09

Pérdida de estabilidad

Se determinó la pérdida log₁₀ en el valor de virus a causa del almacenamiento a una temperatura de 25 °C y con una HR del 65 % durante 1, 2, 4, 6, 8 y 12 semanas para la formulación de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el Ejemplo 1 y la formulación de control de la vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el ejemplo comparativo. Los resultados para el punto de tiempo de las 12 semanas se mostrarán en la Tabla 30.

Tabla 30. Pérdida log₁₀ en el valor de virus a causa del almacenamiento en condiciones aceleradas para el punto de tiempo de las 12 semanas.

	TDV-1	TDV-2	TDV-3	TDV-4
Pérdida acelerada de estabilidad Formulaci3n de control	-1.19	-1.44	-1.35	-1.60
Pérdida acelerada de estabilidad Formulaci3n de acdo. con el Ej. 1	-0.52	-0.38	-0.60	-0.92

Se determin3 la p3rdida log10 en el valor de virus a causa del almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C durante 3, 6, 9 y 12 meses para la formulaci3n de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el Ejemplo 1 y la formulaci3n de control de la vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el ejemplo comparativo. Los resultados se mostrar3n en la Tabla 31 y en la **Fig. 1** y la **Fig. 2**.

Tabla 31. P3rdida log10 en el valor de virus a 2-8 °C en el punto de tiempo de los 12 meses.

	TDV-1	TDV-2	TDV-3	TDV-4
P3rdida de estabilidad Formulaci3n de control	-0.38	-0.31	-0.41	-0.44
P3rdida de estabilidad Formulaci3n de acdo. con el Ej. 1	-0.34	-0.29	-0.21	-0.26

Se determin3 la p3rdida log10 en el valor de virus a causa del almacenamiento a una temperatura de 2-8 °C durante 6, 9, 12, 18 y 24 meses para la formulaci3n de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el Ejemplo 3 y la formulaci3n de control de la vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el ejemplo comparativo. Los resultados se mostrar3n en la Tabla 32 y en la **Fig. 4** y la **Fig. 5**.

Tabla 32. P3rdida log10 en el valor de virus a 2-8 °C en el punto de tiempo de los 24 meses.

	TDV-1	TDV-2	TDV-3	TDV-4
P3rdida de estabilidad Formulaci3n de control	-0.32	-0.59	-0.73	-0.86
P3rdida de estabilidad	-0.10	-0.28	-0.27	-0.52

Formulación de acdo. con el Ej. 3				
--------------------------------------	--	--	--	--

Se determinó la pérdida log₁₀ en el valor de virus a causa del almacenamiento a una temperatura de -20 °C durante 24 meses para la formulación de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el Ejemplo 3 y la formulación de control de la vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el ejemplo comparativo. Los resultados se mostrarán en la Tabla 33.

Tabla 33. Pérdida log₁₀ en el valor de virus a -20 °C en el punto de tiempo de los 24 meses.

	TDV-1	TDV-2	TDV-3	TDV-4
Pérdida de estabilidad Formulación de control	-0.24	-0.05	-0.07	-0.11
Pérdida de estabilidad Formulación de acdo. con el Ej. 3	-0.09	-0.06	-0.01	-0.09

Se estudió la duración del tiempo en solución (TIS, por sus siglas en inglés) hasta 36 horas para la formulación de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el Ejemplo 4 y la formulación de control de vacuna contra el dengue preparada de acuerdo con el ejemplo comparativo. El TIS posformulación comienza con la finalización de los añadidos a la formulación y finaliza al iniciar el proceso de liofilización. Los resultados se mostrarán en la Tabla 34.

Tabla 34. Datos de TIS posformulación (tasa de degradación).

	TDV-1	TDV-2	TDV-3	TDV-4
	log UFP/ml/h	log UFP /ml/h	log UFP /ml/h	log UFP /ml/h
Tasa de degradación Formulación de control	-0.0159	-0.0092	-0.0291	-0.0029
Tasa de degradación Formulación de acdo. con el Ej. 4	-0.0131	-0.0050	-0.0094	-0.0024
Ratio (Control / Ej. 4)	1.21	1.84	3.10	1.21

Las tasas de degradación de TIS posformulación para todos los serotipos TDV se han mejorado para la formulación de acuerdo con la presente invención en comparación con la formulación de

control. Con una tasa de pérdida que es 3.1 veces inferior al TIS posformulación para la formulación de control, TDV3 presenta la mejora más importante. La segunda mejora más importante, TDV2, tuvo una tasa de pérdida que fue 1.84 veces inferior que el TIS posformulación para la formulación de control. La tasa de pérdida presentó una pequeña mejora en TDV1 y TDV4.

ESTUDIO COMPARATIVO

El objetivo de este estudio era evaluar las diferencias de rendimiento y características entre la formulación de acuerdo con la presente invención y la formulación 20 propuesta en el documento US 2020/0390877, Ejemplo 11. Las concentraciones de excipientes de la formulación 20 se muestran en la Tabla 35.

Tabla 35. Aportes de excipientes Formulación 20.

Excipiente	Concentración (g/L)
Fosfato de potasio monobásico anhidro ACS 99 %	1.50
Sacarosa	90.00
Cloruro de sodio	2.92
Carboximetilcelulosa de sodio	5.00
Propilengilcol	5.00
L Leucina	3.28
Ajuste de pH a 7.5	

Para comparar el efecto estabilizador de la formulación 20 y la formulación inventiva sobre el virus del dengue, se formuló la sustancia medicinal TDV1, TDV2, TDV3 y TDV4 con la formulación 20 («formulación comparativa 20» en lo sucesivo) y se probó frente a la formulación inventiva de acuerdo con el Ejemplo 4 descrito en el presente documento. La concentración final de la sustancia medicinal fue la misma en ambas formulaciones, como se muestra en la tabla 36.

Tabla 36. Composición de formulaciones contra el dengue.

Volumen total del lote: 250 mL		
	Formulación de acdo. con el Ejemplo 4	Formulación comparativa 20
TDV1 (g)	12.12	12.12
TDV2 (g)	12.40	12.40

TDV3 (g)	1.08	1.08
TDV4 (g)	0.36	0.36
Excipientes (g)	233.82 (trehalosa dihidrato, poloxámero 407, HSA, hidrogenofosfato disódico dihidrato, trometamina, Tris HCl, L-Arginina HCl, Urea, cloruro de potasio cloruro de sodio)	233.82 (fosfato de potasio, sacarosa, cloruro de sodio, carboximetilcelulosa de sodio, propilenglicol, L-leucina)

Observaciones preliminares

La composición de excipientes de la formulación 20 era más de 2 veces más viscosa que la composición de excipientes del Ejemplo 4. Mientras que se pudo filtrar 1 L de la composición de excipientes del Ejemplo 4 a través de un filtro de 0.22 μm para esterilización, la composición de excipientes de la formulación 20 obstruyó el filtro de taza de 0.22 μm después de filtrar 300 mL, por lo que se utilizaron 2 tazas de filtro de 0.22 μm de 1 L, así como 1 taza de filtro de 0.22 μm de 500 mL para filtrar todo el volumen. La obstrucción pudo deberse a la alta viscosidad de la composición de excipientes de la formulación 20 y/o a la presencia de excipientes tales como carboximetilcelulosa de sodio.

Cada composición de excipientes se combinó con la composición contra el virus del dengue tetravalente, lo que dio como resultado una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa. Las propiedades biofísicas de las formulaciones de vacuna contra el dengue en forma acuosa se muestran en la Tabla 37.

Tabla 37. Propiedades biofísicas de las formulaciones contra el dengue.

	Formulación de acdo. con el Ejemplo 4	Formulación comparativa 20
Densidad a 20 °C (g/mL)	1.039	1.042
Viscosidad dinámica (cP)	1.4	4.0
pH final	7.56	7.57

Osmolalidad (mOsm/kg)	495.00±1.00	595.67±5.78
--------------------------	-------------	-------------

Mediciones de estabilidad

Se evaluó la estabilidad líquida de la formulación comparativa 20 y la formulación de acuerdo con el Ejemplo 4 a 2 – 8 °C durante una duración total de 30 días mediante el uso de Immuno-Focus Assay (IFA) para potencia. Se tomaron muestras en los puntos de tiempo: Día 0 y Día 30. Las muestras del Día 0 se congelaron en -80 °C hasta el momento de la prueba. Los resultados se mostrarán en la Tabla 38 y en la Fig. 6.

Tabla 38. Valor de virus medio en el día 0, y en el día 30 después de la exposición de las formulaciones líquidas a 2-8 °C.

	Valor (log ₁₀ UFP/dosis)							
	TDV-1		TDV-2		TDV-3		TDV-4	
	Día 0	Día 30	Día 0	Día 30	Día 0	Día 30	Día 0	Día 30
Formulación Comparativa 20	6.07	3.93	5.18	3.07	5.92	2.38	6.62	2.63
Formulación de acdo. con el Ejemplo 4	6.21	5.54	5.35	4.9	5.91	4.99	*	4.72
* El valor estuvo por encima del límite de detección del ensayo.								

La formulación comparativa 20 mostró una pérdida de potencia significativamente más alta después de 30 días en comparación con la formulación de acuerdo con el Ejemplo 4.

OTROS ELEMENTOS DE LA INVENCION

La invención está relacionada en particular a los siguientes puntos adicionales:

- Una formulación de vacuna contra el dengue que comprende:
una composición de virus del dengue tetravalente que comprende un serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado, un serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado, un serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado y un serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado;
al menos un disacárido no reductor;

al menos un poloxámero;

urea;

al menos un aminoácido con una cadena lateral de carga positiva con un pH neutro;

trometamina; y

5 seroalbúmina humana.

2. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con el punto 1, donde el al menos un disacárido no reductor es trehalosa y el al menos un aminoácido con una cadena lateral de carga positiva y con un pH neutro es clorhidrato de arginina.

3. Una formulación de vacuna contra el dengue que comprende:

10 A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:

(i) un serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2/1 del dengue de carácter quimérico,

(ii) un serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2 del dengue,

(iii) un serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2/3 del

15 dengue de carácter quimérico, y

(iv) un serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2/4 del dengue de carácter quimérico; y

B. una composición de excipientes que comprende:

a. trehalosa,

20 b. poloxámero,

c. urea,

d. clorhidrato de arginina,

e. trometamina, y

f. seroalbúmina humana.

25 4. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 3, donde el clorhidrato de arginina está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 5.0 % p/p de clorhidrato de arginina, preferiblemente alrededor de 0.5 a 5.0 % p/p, más preferiblemente alrededor de 1.0 a 4.0 % p/p, con particular preferencia alrededor de 2.0 a 3.0 % p/p, tal como alrededor de 2.4 % p/p en función del peso seco de la
30 formulación de vacuna.

5. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 4, donde el clorhidrato de arginina está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.0 mg/dosis unitaria, preferiblemente alrededor de 0.2 a 1.5 mg/dosis unitaria, o alrededor de 0.5 a 1.2 mg/dosis unitaria, más preferiblemente alrededor de 0.5 a
35 1.0 mg/dosis unitaria, con particular preferencia en una cantidad de alrededor de 0.6 a 0.8 mg/dosis

unitaria.

6. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 5, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 0.5 a 5.0 g/L, preferiblemente de 0.5 a menos de 2.5 g/L, más preferiblemente alrededor de 1.3 a 1.65 g/L, con particular preferencia de 1.65 g/L o menos, tal como alrededor de 1.4 g/L.

7. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 2 a 6, donde el clorhidrato de arginina es clorhidrato de L-arginina.

8. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 7, donde la urea está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 6.0 % p/p de urea, preferiblemente alrededor de 0.5 a 5.0 % p/p, más preferiblemente alrededor de 1.0 a 4.0 % p/p, con particular preferencia alrededor de 2.0 a 4.0 % p/p, tal como alrededor de 2.9 % p/p en función del peso seco de la formulación de vacuna.

9. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 8, donde la urea está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 3.0 mg/dosis unitaria, preferiblemente alrededor de 0.1 a 2.0 mg/dosis unitaria, o alrededor de 0.3 a 1.5 mg/dosis unitaria, más preferiblemente alrededor de 0.6 a 1.2 mg/dosis unitaria, con particular preferencia en una cantidad de alrededor de 0.75 a 1.0 mg/dosis unitaria.

10. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 9, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende urea en una concentración de alrededor de 0.1 a 6.0 g/L, preferiblemente de 0.5 a menos de 3.0 g/L, más preferiblemente alrededor de 1.5 a 2.0 g/L, con particular preferencia alrededor de 2.0 g/L o menos, tal como alrededor de 1.65 g/L.

11. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 10, donde la seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p, preferiblemente alrededor de 0.1 a 2.0 % p/p, más preferiblemente alrededor de 0.1 a 1.5 % p/p, con particular preferencia alrededor de 0.1 a 1.0 % p/p, o 1.0 % p/p o menos en función del peso seco de la formulación de vacuna.

12. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 11, donde la seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.05 a 0.5 mg/dosis unitaria, preferiblemente alrededor de 0.1 a

0.4 mg/dosis unitaria, más preferiblemente menos de 0.4 mg/dosis unitaria, con particular preferencia alrededor de 0.25 a 0.33 mg/dosis unitaria, o 0.3 mg/dosis unitaria o menos.

5 13. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 12, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende la seroalbúmina humana en una concentración de 0.1 a menos de 1 g/L, preferiblemente alrededor de 0.3 a 0.9 g/L, más preferiblemente alrededor de 0.5 a 0.7 g/L, con particular preferencia 0.7 g/L o menos, tal como alrededor de 0.6 g/L.

10 14. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 13, donde la seroalbúmina humana es seroalbúmina humana natural.

15. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 14, donde la seroalbúmina humana comprende seroalbúmina humana recombinante.

15 16. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 15, donde la trehalosa está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 65 a 95 % p/p, preferiblemente alrededor de 70 a 95 % p/p, más preferiblemente alrededor de 75 a 95 % p/p, con particular preferencia al menos 80 % p/p, tal como 80 a 95 % p/p, o 80 a 90 % p/p, o 85 a 95 % p/p, o 85 a 90 % p/p, o alrededor de 87 % p/p en función del peso seco de la formulación de vacuna.

20 17. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 16, donde la trehalosa está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 20 a 34 mg/dosis unitaria, preferiblemente alrededor de 22 a 32 mg/dosis unitaria, más preferiblemente alrededor de 23 a 30 mg/dosis unitaria, con particular preferencia alrededor de 23 a 27 mg/dosis unitaria, o 27 mg/dosis unitaria o menos.

25 18. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 17, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende trehalosa en una concentración de alrededor de 40 a 80 g/L, preferiblemente alrededor de 40 a 70 g/L, más preferiblemente alrededor de 45 a 60 g/L, con particular preferencia 60 g/L o menos, tal como alrededor de 55 g/L.

19. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 2 a 18, donde la trehalosa es α,α -trehalosa.

35 20. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 19, donde el poloxámero está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad

de alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p, preferiblemente alrededor de 0.1 a 5.0 % p/p, más preferiblemente alrededor de 0.5 a 4.0 % p/p, con particular preferencia menos de 4.0 % p/p, o alrededor de 2.9 % p/p o menos en función del peso seco de la formulación de vacuna.

5 21. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 20, donde el poloxámero está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 3.0 mg/dosis unitaria, preferiblemente alrededor de 0.3 a 1.5 mg/dosis unitaria, más preferiblemente alrededor de 0.6 a 1.2 mg/dosis unitaria, con particular preferencia alrededor de 0.75 a 1.0 mg/dosis unitaria, o 1.0 mg/dosis unitaria o menos.

10 22. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 21, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende poloxámero en una concentración de alrededor de 0.1 a 5.0 g/L, preferiblemente de 0.5 a menos de 3.0 g/L, más preferiblemente alrededor de 1.5 a 2.0 g/L, con particular preferencia
15 alrededor de 2.0 g/L o menos, tal como alrededor de 1.65 g/L.

23. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 22, donde el poloxámero es poloxámero 407.

20 24. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 23, donde la trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p, preferiblemente alrededor de 0.1 a 3.0 % p/p, más preferiblemente alrededor de 0.5 a 2.0 % p/p, con particular preferencia menos de 2.0 % p/p, tal como alrededor de 1.2 % p/p en función del peso seco de la formulación de vacuna.

25 25. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 24, donde la trometamina está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.05 a 1.0 mg/dosis unitaria, preferiblemente alrededor de 0.1 a 0.6 mg/dosis unitaria, más preferiblemente alrededor de 0.2 a 0.5 mg/dosis unitaria, con particular preferencia alrededor de 0.3 a 0.4 mg/dosis unitaria, o 0.4 mg/dosis unitaria o menos.

30 26. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 25, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende trometamina en una concentración de alrededor de 0.1 a 1.5 g/L, preferiblemente de 0.5 a menos de 1.2 g/L, más preferiblemente alrededor de 0.5 a 1.0 g/L, con particular preferencia
35 0.8 g/L o menos, tal como alrededor de 0.7 g/L.

27. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 26,

donde la formulación de vacuna contra el dengue comprende, en función del peso seco de la formulación de vacuna:

- a. alrededor de 65 a 95 % p/p de trehalosa,
- b. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de poloxámero,
- 5 c. alrededor de 0.1 a 6.0 % p/p de urea,
- d. alrededor de 0.1 a 5.0 % p/p de clorhidrato de arginina,
- e. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de trometamina, y
- f. alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p de seroalbúmina humana.

28. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 27,
10 que comprende

- a. trehalosa en una cantidad de alrededor de 20 a 34 mg/dosis unitaria,
- b. poloxámero en una cantidad de alrededor de 0.1 a 3.0 mg/dosis unitaria,
- c. urea en una cantidad de alrededor de 0.1 a 3.0 mg/dosis unitaria,
- d. clorhidrato de arginina en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.0 mg/dosis unitaria,
- 15 e. trometamina en una cantidad de alrededor de 0.05 a 1.0 mg/dosis unitaria, y
- f. seroalbúmina humana en una cantidad de alrededor de 0.05 a 0.5 mg/dosis unitaria.

29. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 28,
donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la
reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la
20 reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL,
comprende:

- a. trehalosa en una concentración de 40 a 80 g/L,
- b. poloxámero en una concentración de alrededor de 0.1 a 5.0 g/L,
- c. urea en una concentración de alrededor de 0.1 a 6.0 g/L,
- 25 d. clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 0.5 a 5.0 g/L,
- e. trometamina en una concentración de alrededor de 0.1 a 1.5 g/L, y
- f. seroalbúmina humana en una concentración de 0.1 a menos de 1 g/L.

30. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 29,
que comprende además sales de fosfato, tales como dihidrogenofosfato de potasio o
30 hidrogenofosfato disódico.

31. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 30,
donde las sales de fosfato están contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una
cantidad de menos de 1.0 % p/p, o alrededor de 0.05 a 0.5 % p/p, preferiblemente alrededor de 0.2
a 0.4 % p/p, más preferiblemente 0.3 % p/p o menos en función del peso seco de la formulación de
35 vacuna.

32. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 31, donde las sales de fosfato están contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 0.3 mg/dosis unitaria, o alrededor de 0.01 a 0.2 mg/dosis unitaria, preferiblemente alrededor de 0.08 a 0.1 mg/dosis unitaria, más preferiblemente 0.1 mg/dosis unitaria o menos.

33. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 32, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende sales de fosfato en una concentración de menos de 0.3 g/L, o alrededor de 0.16 a 0.22 g/L, preferiblemente 0.22 g/L o menos, tal como alrededor de 0.18 g/L.

34. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 30 a 33, donde las sales de fosfato son dihidrogenofosfato de potasio e hidrogenofosfato disódico.

35. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 34 que comprende además sales de cloruro, tales como cloruro de sodio o cloruro de potasio.

36. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 35, donde las sales de cloruro están contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 4.0 % p/p, o alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p en función del peso seco de la formulación de vacuna.

37. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 36, donde el cloruro de sodio está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 1.0 % p/p a 3.0 % p/p, preferiblemente 2.1 % p/p o menos en función del peso seco de la formulación de vacuna.

38. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 37, donde el cloruro de potasio está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.01 % p/p a 0.05 % p/p, preferiblemente 0.03 % p/p o menos en función del peso seco de la formulación de vacuna.

39. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 38, donde las sales de cloruro están contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 2.0 mg/dosis unitaria, preferiblemente alrededor de 0.1 a 1.0 mg/dosis unitaria, más preferiblemente alrededor de 0.55 a 0.75 mg/dosis unitaria.

40. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 39, donde el cloruro de sodio está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de 0.72 mg/dosis unitaria o menos.

41. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 40,

donde el cloruro de potasio está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de 0.01 mg/dosis unitaria o menos.

42. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 41, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende sales de cloruro en una concentración de menos de 5 g/L, preferiblemente alrededor de 3.3 a 3.6 g/L, más preferiblemente alrededor de 3.6 g/L o menos tal como alrededor de 3.4 g/L.

43. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 42, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende cloruro de sodio en una concentración de menos de 5 g/L, preferiblemente alrededor de 3.3 a 3.6 g/L, más preferiblemente alrededor de 3.6 g/L o menos tal como alrededor de 3.4 g/L.

44. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 43 que comprende además ácido clorhídrico.

45. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 44, donde el ácido clorhídrico está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 1.0 % p/p, o alrededor de 0.05 a 0.5 % p/p, preferiblemente alrededor de 0.2 a 0.4 % p/p, más preferiblemente alrededor de 0.3 % p/p o menos en función del peso seco de la formulación de vacuna.

46. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 45, donde el ácido clorhídrico está contenido en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.01 a 0.5 mg/dosis unitaria, preferiblemente menos de 0.2 mg/dosis unitaria, o alrededor de 0.07 a 0.1 mg/dosis unitaria, más preferiblemente 0.1 mg/dosis unitaria o menos.

47. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 46, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende ácido clorhídrico en una concentración de alrededor de 0.05 a 0.3 g/L, preferiblemente alrededor de 0.15 a 0.19 g/L, más preferiblemente 0.19 g/L o menos, tal como alrededor de 0.16 g/L.

48. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 47, donde la formulación de vacuna contra el dengue comprende:

a. trehalosa,

- b. poloxámero,
- c. urea,
- d. clorhidrato de arginina,
- e. trometamina,
- 5 f. seroalbúmina humana,
- g. sales de cloruro, y
- h. sales de fosfato.
49. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 48, donde la formulación de vacuna contra el dengue comprende, en función del peso seco de la
- 10 formulación de vacuna:
- a. alrededor de 65 a 95 % p/p de trehalosa,
- b. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de poloxámero,
- c. alrededor de 0.1 a 6.0 % p/p de urea,
- d. alrededor de 0.1 a 5.0 % p/p de clorhidrato de arginina,
- 15 e. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de trometamina,
- f. alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p de seroalbúmina humana
- g. alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p de sales de cloruro, y
- h. alrededor de 0.05 a 0.5 % p/p de sales de fosfato.
50. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 49, donde la formulación de vacuna contra el dengue comprende, en función del peso seco de la
- 20 formulación de vacuna:
- a. alrededor de 65 a 95 % p/p de trehalosa,
- b. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de poloxámero,
- c. alrededor de 0.1 a 6.0 % p/p de urea,
- 25 d. alrededor de 0.1 a 5.0 % p/p de clorhidrato de arginina,
- e. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de trometamina,
- f. alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p de seroalbúmina humana
- g. alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p de sales de cloruro,
- h. alrededor de 0.05 a 0.5 % p/p de sales de fosfato, e
- 30 i. alrededor de 0.05 a 0.5 % p/p de ácido clorhídrico.
51. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 50, que comprende
- a. trehalosa en una cantidad de alrededor de 20 a 34 mg/dosis unitaria,
- b. poloxámero en una cantidad de alrededor de 0.1 a 3.0 mg/dosis unitaria,
- 35 c. urea en una cantidad de alrededor de 0.1 a 3.0 mg/dosis unitaria,

- d. clorhidrato de arginina en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.0 mg/dosis unitaria,
- e. trometamina en una cantidad de alrededor de 0.05 a 1.0 mg/dosis unitaria,
- f. seroalbúmina humana en una cantidad de alrededor de 0.05 a 0.5 mg/dosis unitaria,
- g. sales de cloruro en una cantidad de menos de 2.0 mg/dosis unitaria, y
- h. sales de fosfato en una cantidad de menos de 0.3 mg/dosis unitaria.

52. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 51, que comprende

- a. trehalosa en una cantidad de alrededor de 20 a 34 mg/dosis unitaria,
- b. poloxámero en una cantidad de alrededor de 0.1 a 3.0 mg/dosis unitaria,
- c. urea en una cantidad de alrededor de 0.1 a 3.0 mg/dosis unitaria,
- d. clorhidrato de arginina en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.0 mg/dosis unitaria,
- e. trometamina en una cantidad de alrededor de 0.05 a 1.0 mg/dosis unitaria,
- f. seroalbúmina humana en una cantidad de alrededor de 0.05 a 0.5 mg/dosis unitaria,
- g. sales de cloruro en una cantidad de menos de 2.0 mg/dosis unitaria,
- h. sales de fosfato en una cantidad de menos de 0.3 mg/dosis unitaria, e
- i. ácido clorhídrico en una cantidad de 0.01 a 0.5 mg/dosis unitaria.

53. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 52, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende:

- a. la trehalosa en una concentración de 40 a 80 g/L,
- b. el poloxámero en una concentración de alrededor de 0.1 a 5.0 g/L,
- c. la urea en una concentración de alrededor de 0.1 a 6.0 g/L,
- d. el clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 0.5 a 5.0 g/L,
- e. la trometamina en una concentración de alrededor de 0.1 a 1.5 g/L,
- f. la seroalbúmina humana en una concentración de 0.1 a menos de 1 g/L,
- g. sales de cloruro en una concentración de alrededor de 3.3 a 3.6 g/L,
- h. sales de fosfato en una concentración de alrededor de 0.16 a 0.22 g/L.

54. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 53, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende:

- a. la trehalosa en una concentración de 40 a 80 g/L,

- b. el poloxámero en una concentración de alrededor de 0.1 a 5.0 g/L,
- c. la urea en una concentración de alrededor de 0.1 a 6.0 g/L,
- d. el clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 0.5 a 5.0 g/L,
- e. la trometamina en una concentración de alrededor de 0.1 a 1.5 g/L,
- 5 f. la seroalbúmina humana en una concentración de 0.1 a menos de 1 g/L,
- g. sales de cloruro en una concentración de alrededor de 3.3 a 3.6 g/L,
- h. sales de fosfato en una concentración de alrededor de 0.16 a 0.22 g/L, e
- i. ácido clorhídrico en una concentración de alrededor de 0.05 a 0.3 g/L.

10 55. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 2 a 54, donde la relación de la cantidad de clorhidrato de arginina con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 4:1.

15 56. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 2 a 55, donde la relación de la cantidad de clorhidrato de arginina con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 2:1 a 3:1.

57. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 2 a 56, donde la relación de la cantidad de clorhidrato de arginina con respecto a la cantidad de trometamina contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 3:1.

20 58. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 2 a 57, donde la relación de la cantidad de clorhidrato de arginina con respecto a la cantidad de trometamina contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1.5:1 a 2.5:1.

25 59. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 58, donde la relación de la cantidad de urea con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 5:1.

60. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 59, donde la relación de la cantidad de clorhidrato de arginina con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 2:1 a 4:1.

30 61. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 2 a 60, donde la relación de la cantidad de urea con respecto a la cantidad de clorhidrato de arginina contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 2:1.

35 62. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 61, donde la relación de la cantidad de urea con respecto a la cantidad de poloxámero contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 2:1.

63. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 2 a 62, donde la relación de la cantidad de urea con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 20:1 a 40:1.

64. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 2 a 63, donde la relación de la cantidad de urea con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 25:1 a 35:1.

65. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 64, donde la formulación de vacuna contra el dengue no tiene manitol.

66. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 65, donde la formulación de vacuna contra el dengue no tiene sorbitol.

67. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 66, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende:

- (i) el virus del dengue serotipo 1 en una concentración de al menos 3.3 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (ii) el serotipo 2 del virus del dengue en una concentración de al menos 2.7 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (iii) el serotipo 3 del virus del dengue en una concentración de al menos 4.0 log₁₀ ufp/0.5 mL, y
- (iv) el serotipo 4 del virus del dengue en una concentración de al menos 4.5 log₁₀ ufp/0.5 mL.

68. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 67, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende:

- (i) el virus del dengue serotipo 1 en una concentración de al menos 3.3 log₁₀ ufp/0.5 mL a 3.8 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (ii) el serotipo 2 del virus del dengue en una concentración de al menos 2.7 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (iii) el serotipo 3 del virus del dengue en una concentración de al menos 4.0 log₁₀ ufp/0.5 mL, y
- (iv) el serotipo 4 del virus del dengue en una concentración de al menos 4.5 log₁₀ ufp/0.5 mL o al menos 4.6 log₁₀ ufp/0.5 mL hasta opcionalmente 6.2 log₁₀ ufp/0.5 mL.

69. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 68, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende:

- (i) el serotipo 1 del virus del dengue en una concentración de 3.3 log₁₀ ufp/0.5 mL a 3.6 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (ii) el serotipo 2 del virus del dengue en una concentración de 2.7 log₁₀ ufp/0.5 mL a 4.0 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- 5 (iii) el serotipo 3 del virus del dengue en una concentración de 4.0 log₁₀ ufp/0.5 mL a 4.6 log₁₀ ufp/0.5 mL, y
- (iv) el serotipo 4 del virus del dengue en una concentración de 4.5 log₁₀ ufp/0.5 mL o 4.6 log₁₀ ufp/0.5 mL a 5.1 log₁₀ ufp/0.5 mL.

70. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 69, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, (i), (ii), (iii) y (iv) proporciona una concentración total de ufp/0.5 mL y en función de dicha concentración total de ufp/0.5 mL

15 la concentración de (i) en ufp/0.5 mL es de al menos 1 %,
la concentración de (ii) en ufp/0.5 mL es de menos de 10 %,
la concentración de (iii) en ufp/0.5 mL es de al menos 10 %, y
la concentración de (iv) en ufp/0.5 mL es de al menos 50 %.

71. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 70, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, (i), (ii), (iii) y (iv) proporciona una concentración total de ufp/0.5 mL y en función de dicha concentración total de ufp/0.5 mL

25 la concentración de (i) en ufp/0.5 mL es de 1 % a 7 %,
la concentración de (ii) en ufp/0.5 mL es de 8 % o menos, tal como en el intervalo de 1 % a 8 %,
la concentración de (iii) en ufp/0.5 mL es de al menos 10 %, y
la concentración de (iv) en ufp/0.5 mL es de al menos 65 %, tal como en el intervalo de 65 % a 80 %.

72. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 71, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, (i), (ii), (iii) y (iv) proporciona una concentración total de ufp/0.5 mL y en función de dicha concentración total de ufp/0.5 mL la concentración de (iii) en ufp/0.5 mL es de al menos 12 %, o al menos 14 %, o al menos 16 %, o al menos 18 %.

73. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 72, donde la composición de virus del dengue tetravalente incluye al menos un virus del dengue no quimérico y al menos un virus del dengue quimérico.

74. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 73, donde el serotipo 1 de dengue es una cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico, el serotipo 2 de dengue es una cepa de serotipo 2 de dengue de carácter no quimérico, el serotipo 3 de dengue es una cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico y el serotipo 4 de dengue es una cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico.

75. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 74, donde la cepa de serotipo 2 de dengue deriva de la cepa de virus DEN-2 PDK-53 vivo atenuado y las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 de dengue al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 de dengue con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos de dengue.

76. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 75, donde el serotipo 1 del dengue es TDV-1, el serotipo 2 del dengue es TDV-2, el serotipo 3 del dengue es TDV-3 y el serotipo 4 del dengue es TDV-4.

77. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 74 a 76, donde la cepa de serotipo 2 del dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 16681 en estado natural y difiere en al menos tres nucleótidos de la versión en estado natural tal como se detallará a continuación:

- a) región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57)
- b) NS1-53 Gly a Asp (nt-2579)
- c) NS3-250 Glu a Val (nt-5270); y

donde las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos de dengue, lo que da como resultado las siguientes cepas quiméricas de dengue:

- una quimera de DENV-2/1,
- una quimera de DENV-2/3 y
- una quimera de DENV-2/4.

78. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 77, donde el serotipo 1 del dengue se caracteriza por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 2, el serotipo 2 del dengue se caracteriza por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 4, el serotipo 3 del dengue se caracteriza por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 6, y el serotipo 4 del dengue se caracteriza por la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO. 8.

79. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 78, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende:

- (i) una cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos $3.3 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (ii) una cepa de serotipo 2 de dengue en una concentración de al menos $2.7 \log_{10}$ ufp/0.5 mL,
- (iii) una cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos $4.0 \log_{10}$ ufp/0.5 mL, y
- (iv) una cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos $4.5 \log_{10}$ ufp/0.5 mL;

donde, tras dicha reconstitución (i), (ii), (iii) y (iv), se proporciona una concentración total de ufp/0.5 mL y en función de dicha concentración total de ufp/0.5 mL

la concentración de (i) en ufp/0.5 mL es de al menos 1 %,
 la concentración de (ii) en ufp/0.5 mL es de menos de 10 %,
 la concentración de (iii) en ufp/0.5 mL es de al menos 10 %, y
 la concentración de (iv) en ufp/0.5 mL es de al menos 50 %;

donde la cepa de serotipo 2 del dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 16681 en estado natural y difiere en al menos tres nucleótidos con respecto a la versión en estado natural tal como se detallará a continuación:

- a) región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57)
- b) NS1-53 Gly a Asp (nt-2579)
- c) NS3-250 Glu a Val (nt-5270); y

donde las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos de dengue, lo que da como resultado las siguientes cepas quiméricas de dengue:

- una quimera de DENV-2/1,
- una quimera de DENV-2/3 y
- una quimera de DENV-2/4.

80. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 79, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL,

comprende:

- (i) una cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos 3.3 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (ii) una cepa de serotipo 2 de dengue en una concentración de al menos 2.7 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (iii) una cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos 4.0 log₁₀ ufp/0.5 mL, y
- (iv) una cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos 4.5 log₁₀ ufp/0.5 mL;

donde, tras dicha reconstitución (i), (ii), (iii) y (iv), se proporciona una concentración total de ufp/0.5 mL y en función de dicha concentración total de ufp/0.5 mL

la concentración de (i) en ufp/0.5 mL es de al menos 1 %,

la concentración de (ii) en ufp/0.5 mL es de menos de 10 %,

la concentración de (iii) en ufp/0.5 mL es de al menos 10 %, y

la concentración de (iv) en ufp/0.5 mL es de al menos 50 %;

donde la cepa de serotipo 2 del dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 16681 en estado natural y difiere en al menos tres nucleótidos con respecto a la versión en estado natural tal como se detallará a continuación:

- a) región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57)
- b) NS1-53 Gly a Asp (nt-2579)
- c) NS3-250 Glu a Val (nt-5270);

donde las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos de dengue, lo que da como resultado las siguientes cepas quiméricas de dengue:

- una quimera de DENV-2/1,
- una quimera de DENV-2/3 y
- una quimera de DENV-2/4; y

donde, tras dicha reconstitución, la formulación de vacuna contra el dengue comprende:

- a. la trehalosa en una concentración de 40 a 80 g/L, tal como alrededor de 55 g/L o alrededor de 43 g/L,
- b. el poloxámero en una concentración de alrededor de 0.1 a 5.0 g/L, tal como alrededor de 1.65 g/L o alrededor de 1.42 g/L,
- c. la urea en una concentración de alrededor de 0.1 a 6.0 g/L, tal como alrededor de 1.65 g/L o alrededor de 1.42 g/L,
- d. el clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 0.5 a 5.0 g/L, tal como

alrededor de 1.4 g/L o alrededor de 1.18 g/L,

e. la trometamina en una concentración de alrededor de 0.1 a 1.5 g/L, tal como alrededor de 0.7 g/L o alrededor de 0.6 g/L, y

f. la seroalbúmina humana en una concentración de 0.1 a menos de 1 g/L, tal como alrededor de 0.55 g/L o alrededor de 0.48 g/L.

81. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 80, donde la composición de virus del dengue tetravalente es «TAK-003».

82. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 81 en forma seca, que tiene un contenido de humedad residual de menos de 2 % p/p, preferiblemente menos de 1 % p/p, más preferiblemente menos de 0.9 % p/p o menos de 0.8 % p/p en forma seca.

83. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 82, que es una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada.

84. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 83, donde la cantidad de virus del dengue antes de la liofilización y la cantidad de virus del dengue inmediatamente después de la liofilización difieren en menos de 0.46 log₁₀ ufp/dosis unitaria, preferiblemente en menos de 0.4 log₁₀ ufp/dosis unitaria, más preferiblemente en menos de 0.3 log₁₀ ufp/dosis unitaria, o menos de 0.25 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4.

85. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 84, donde la cantidad de virus del dengue inmediatamente después de la liofilización y la cantidad de virus del dengue después de la liofilización y el almacenamiento a alrededor de 25 °C y con una humedad relativa del 65 % durante 12 semanas difieren en menos de 1.6 log₁₀ ufp/dosis unitaria, preferiblemente en menos de 1.4 log₁₀ ufp/dosis unitaria, más preferiblemente en menos de 1.2 log₁₀ ufp/dosis unitaria, o menos de 1.0 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4.

86. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 85, donde la cantidad de virus del dengue inmediatamente después de la liofilización y la cantidad de virus del dengue después de la liofilización y el almacenamiento a 2-8 °C durante 12 meses difieren en menos de 0.44 log₁₀ ufp/dosis unitaria, preferiblemente en menos de 0.4 log₁₀ ufp/dosis unitaria, más preferiblemente en menos de 0.35 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4.

87. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 86, donde la cantidad de virus del dengue inmediatamente después de la liofilización y la cantidad de virus del dengue después de la liofilización y el almacenamiento a 2-8 °C durante 18 meses difieren en menos de 0.7 log₁₀ ufp/dosis unitaria, preferiblemente en menos de 0.6 log₁₀ ufp/dosis unitaria,

más preferiblemente en menos de 0.5 log₁₀ ufp/dosis unitaria o menos de 0.4 log₁₀ ufp/dosis unitaria para cada uno de los serotipos 1 a 4.

88. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 87, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, tiene un pH a 25 °C de alrededor de 7.0 a 8.5, preferiblemente alrededor de 7.3 a 8.0, más preferiblemente alrededor de 7.4 a 7.8, o alrededor de 7.6.

89. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 88, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, tiene una osmolalidad de alrededor de 100 a 700 mOsmol/kg, preferiblemente de alrededor de 100 a menos de 700 mOsmol/kg, más preferiblemente de alrededor de 100 a 400 mOsmol/kg, o alrededor de 300 mOsmol/kg.

90. Una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que se puede obtener al reconstituir la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 89 en forma seca con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable.

91. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 6 a 90, donde el diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable se selecciona dentro del grupo que consiste en agua para inyección y una solución acuosa de cloruro de sodio.

92. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 6 a 91, donde el diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM.

93. Un recipiente, tal como un vial, que comprende la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92.

94. Un recipiente, tal como un vial, que comprende de una a diez dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92.

95. Un recipiente, tal como un vial, que comprende una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92.

96. Un recipiente, tal como un vial, que comprende múltiples dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92.

97. Un recipiente, tal como un vial, que comprende cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92.

98. El recipiente, tal como un vial, de acuerdo con el punto 97, donde el clorhidrato de arginina

está contenido en una cantidad de alrededor de 1.5 a 7.5 mg, preferiblemente alrededor de 2.0 a 6.0 mg, más preferiblemente alrededor de 3.0 a 5.0 mg, con particular preferencia alrededor de 3.5 a 4.5 mg, tal como alrededor de 4.1 mg.

99. El recipiente, tal como un vial, de acuerdo con cualquiera de los puntos 97 o 98, donde la urea está contenida en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg, preferiblemente alrededor de 3.0 a 7.0 mg, más preferiblemente alrededor de 4.0 a 6.0 mg, con particular preferencia alrededor de 4.5 a 5.5 mg, tal como alrededor de 4.95 mg.

100. El recipiente, tal como un vial, de acuerdo con cualquiera de los puntos 97 a 99, donde la seroalbúmina humana está contenida en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.5 mg, preferiblemente alrededor de 0.5 a 2.0 mg, más preferiblemente alrededor de 1.0 a 2.0 mg, con particular preferencia alrededor de 1.5 a 1.8 mg, tal como alrededor de 1.65 mg.

101. El recipiente, tal como un vial, de acuerdo con cualquiera de los puntos 97 a 100, donde la trehalosa está contenida en una cantidad de alrededor de 100 a 170 mg, preferiblemente alrededor de 120 a 170 mg, más preferiblemente alrededor de 140 a 160 mg, con particular preferencia alrededor de 145 a 155 mg, tal como alrededor de 149 mg.

102. El recipiente, tal como un vial, de acuerdo con cualquiera de los puntos 97 a 101, donde el poloxámero está contenido en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg, preferiblemente alrededor de 3.0 a 7.0 mg, más preferiblemente alrededor de 4.0 a 6.0 mg, con particular preferencia alrededor de 4.5 a 5.5 mg, tal como alrededor de 4.95 mg.

103. El recipiente, tal como un vial, de acuerdo con cualquiera de los puntos 97 a 102, donde la trometamina está contenida en una cantidad de alrededor de 0.5 a 4.0 mg, preferiblemente alrededor de 0.5 a 3.5 mg, más preferiblemente alrededor de 1.0 a 3.0 mg, con particular preferencia alrededor de 1.5 a 2.5 mg, tal como alrededor de 2.0 mg.

104. Un recipiente, tal como un vial, que comprende la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92, donde

a. la trehalosa está contenida en una cantidad de alrededor de 100 a 170 mg, tal como alrededor de 149 mg,

b. el poloxámero está contenido en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg, tal como alrededor de 4.95 mg,

c. la urea está contenida en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg, tal como alrededor de 4.95 mg,

d. el clorhidrato de arginina está contenido en una cantidad de alrededor de 1.5 a 7.5 mg, tal como alrededor de 4.1 mg,

e. la trometamina está contenida en una cantidad de alrededor de 0.5 a 4.0 mg, tal como alrededor de 2.0 mg, y

f. la seroalbúmina humana está contenida en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.5 mg, tal como alrededor de 1.65 mg.

105. Un recipiente, tal como un vial, que comprende cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92, donde

5 a. la trehalosa está contenida en una cantidad de alrededor de 100 a 170 mg, tal como alrededor de 149 mg,

b. el poloxámero está contenido en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg, tal como alrededor de 4.95 mg,

10 c. la urea está contenida en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg, tal como alrededor de 4.95 mg,

d. el clorhidrato de arginina está contenido en una cantidad de alrededor de 1.5 a 7.5 mg, tal como alrededor de 4.1 mg,

e. la trometamina está contenida en una cantidad de alrededor de 0.5 a 4.0 mg, tal como alrededor de 2.0 mg, y

15 f. la seroalbúmina humana está contenida en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.5 mg, tal como alrededor de 1.65 mg.

106. El recipiente, tal como un vial, de acuerdo con cualquiera de los puntos 97 a 105, donde las sales de fosfato están contenidas en una cantidad de alrededor de 0.05 a 2.0 mg, preferiblemente alrededor de 0.1 a 1.0 mg, más preferiblemente alrededor de 0.3 a 0.7 mg, con particular preferencia
20 alrededor de 0.4 a 0.6 mg, tal como alrededor de 0.5 mg.

107. El recipiente, tal como un vial con la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 97 a 106, donde las sales de cloruro están contenidas en una cantidad de menos de 5.0 mg, o alrededor de 0.5 a 4.0 mg, preferiblemente alrededor de 1.0 a 4.0 mg, tal como
alrededor de 3.6 mg.

25 108. El recipiente, tal como un vial de acuerdo con cualquiera de los puntos 97 a 107, donde el ácido clorhídrico está contenido en una cantidad de alrededor de 0.05 a 2.0 mg, preferiblemente alrededor de 0.1 a 1.0 mg, más preferiblemente alrededor de 0.3 a 0.7 mg, con particular preferencia alrededor de 0.4 a 0.6 mg, tal como alrededor de 0.5 mg.

109. Un recipiente, tal como un vial, que comprende cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92, donde

30 a. la trehalosa está contenida en una cantidad de alrededor de 100 a 170 mg, tal como alrededor de 149 mg,

b. el poloxámero está contenido en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg, tal como alrededor de 4.95 mg,

35 c. la urea está contenida en una cantidad de alrededor de 2.0 a 8.0 mg, tal como alrededor de

4.95 mg,

d. el clorhidrato de arginina está contenido en una cantidad de alrededor de 1.5 a 7.5 mg, tal como alrededor de 4.1 mg

e. la trometamina está contenida en una cantidad de alrededor de 0.5 a 4.0 mg, tal como alrededor de 2.0 mg,

f. la seroalbúmina humana está contenida en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.5 mg, tal como alrededor de 1.65 mg,

g. las sales de cloruro están contenidas en una cantidad de menos de 5.0 mg,

h. las sales de fosfato están contenidas en una cantidad de alrededor de 0.05 a 2.0 mg, e

i. el ácido clorhídrico está contenido en una cantidad de alrededor de 0.05 a 2.0 mg.

110. El recipiente, tal como un vial, de acuerdo con cualquiera de los puntos 93 a 109, donde la formulación de vacuna contra el dengue está contenida en forma seca, preferiblemente en forma liofilizada.

111. El recipiente, tal como un vial, de acuerdo con cualquiera de los puntos 96 a 110 para proporcionar cinco dosis unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida.

112. Un kit que comprende más de un recipiente, preferiblemente diez, de acuerdo con cualquiera de los puntos 93 a 111, y opcionalmente un recipiente o más de uno, preferiblemente diez, que comprenden un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable para la reconstitución.

113. El kit de acuerdo con el punto 112 para preparar cincuenta dosis unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida.

114. Un kit para preparar una formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida que comprende:

a) la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92 en forma seca, por ejemplo, en forma liofilizada, y

b) un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable para la reconstitución.

115. Un kit para preparar de una a diez dosis unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida que comprende:

a) un recipiente, tal como un vial, que comprende de una a diez dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92 en forma seca, por ejemplo, en forma liofilizada, y

b) un recipiente, tal como un vial, que comprende de una a diez alícuotas de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable para la reconstitución,

donde la cantidad de alícuotas corresponde a la cantidad de dosis unitarias.

116. Un kit para preparar una dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue en

forma reconstituida que comprende:

a) un recipiente, tal como un vial, que comprende una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92 en forma seca, por ejemplo, en forma liofilizada, y

5 b) un recipiente, tal como un vial, que comprende una alícuota de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable para la reconstitución.

117. Un kit para preparar múltiples dosis unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida que comprende:

10 a) un recipiente, tal como un vial, que comprende múltiples dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92 en forma seca, por ejemplo, en forma liofilizada, y

b) un recipiente, tal como un vial, que comprende múltiples alícuotas de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable para la reconstitución, donde la cantidad de alícuotas corresponde a la cantidad de dosis unitarias.

15 118. Un kit para preparar cinco dosis unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue en forma reconstituida que comprende:

a) un recipiente, tal como un vial, que comprende cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92 en forma seca, por ejemplo, en forma liofilizada y

20 b) un recipiente, tal como un vial, que comprende cinco alícuotas de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable para la reconstitución.

119. El kit de acuerdo con cualquiera de los puntos 112 a 118, donde la alícuota tiene un volumen de alrededor de 0.4 a 0.8 mL/dosis unitaria, preferiblemente de alrededor de 0.4 a 0.7 mL/dosis unitaria, más preferiblemente de alrededor de 0.45 a 0.65 mL/dosis unitaria.

25 120. El kit de acuerdo con cualquiera de los puntos 112 a 119, donde el diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable se selecciona dentro del grupo que consiste en agua para inyección y una solución acuosa de cloruro de sodio.

121. El kit de acuerdo con cualquiera de los puntos 112 a 120, donde el diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM.

30 122. Cinco dosis unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que se pueden obtener al reconstituir cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92 en forma seca, por ejemplo, en forma liofilizada, con cinco alícuotas de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable.

35 123. Una dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que se puede obtener al reconstituir una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue de

acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92 en forma seca con una alícuota de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable.

124. Una dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que se puede obtener al reconstituir múltiples dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92 en forma seca con múltiples alícuotas de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, donde la cantidad de alícuotas corresponde a la cantidad de dosis unitarias, y retirar el volumen de una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue reconstituida.

125. Una dosis unitaria de una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que se puede obtener al reconstituir cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92 en forma seca con cinco alícuotas de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable y retirar el volumen de una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue reconstituida.

126. La o las dosis unitarias de acuerdo con cualquiera de los puntos 122 a 125, donde la alícuota tiene un volumen de alrededor de 0.4 a 0.8 mL/dosis unitaria, preferiblemente de alrededor de 0.4 a 0.7 mL/dosis unitaria, más preferiblemente de alrededor de 0.45 a 0.65 mL/dosis unitaria, tal como 0.5 mL/dosis unitaria.

127. La o las dosis unitarias de acuerdo con cualquiera de los puntos 122 a 126, donde el diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable se selecciona dentro del grupo que consiste en agua para inyección y una solución acuosa de cloruro de sodio.

128. La o las dosis unitarias de acuerdo con cualquiera de los puntos 122 a 127, donde el diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable es una solución acuosa de cloruro de sodio a 37 mM.

129. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 128 para el uso en un método de prevención de la enfermedad del dengue en un sujeto, donde el método comprende administrar una vacunación primaria solamente con dos administraciones de una dosis unitaria que comprende las siguientes etapas:

administrar una primera dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto, y administrar una segunda dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto.

130. La formulación de vacuna contra el dengue para el uso en un método de acuerdo con el punto 129, donde la segunda dosis se administra en los 3 meses posteriores a la administración de la primera dosis unitaria.

131. La formulación de vacuna contra el dengue para el uso en un método de acuerdo con el punto 129 o 130, donde se administra una dosis de refuerzo al menos 12 meses después de la administración de dicha segunda dosis unitaria de la vacuna contra el dengue.

132. Un método de prevención de la enfermedad del dengue en un sujeto que comprende

administrar una vacunación primaria solamente con dos administraciones de una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 128 que comprende las siguientes etapas:

administrar una primera dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto, y

5 administrar una segunda dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue al sujeto.

133. El método de prevención de la enfermedad del dengue en un sujeto de acuerdo con el punto 132, donde la segunda dosis se administra en los 3 meses posteriores a la administración de la primera dosis unitaria.

10 134. El método de prevención de la enfermedad del dengue en un sujeto de acuerdo con el punto 132 o 133, donde se administra una dosis de refuerzo al menos 12 meses después de la administración de dicha segunda dosis unitaria de la vacuna contra el dengue.

135. Un método de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa,

15 (b) congelar la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa para formar una formulación de vacuna contra el dengue congelada,

(c) someter la formulación de vacuna contra el dengue congelada a una etapa de secado primario en un aparato con una temperatura de almacenamiento, que varía desde por encima de la temperatura de transición vítrea T_g de la formulación hasta no más de 25 °C por encima, o no más de 20 °C por encima, o no más de 15 °C por encima de la temperatura de transición vítrea T_g y a una presión por debajo de 0.1 mbar para formar un producto secado primario, y

20 (d) someter el producto secado primario a una etapa de secado secundario en un aparato con una temperatura de almacenamiento por encima de la temperatura de almacenamiento de la etapa de secado primario y a una presión por debajo de 1 mbar para formar un producto secado secundario.

136. El método de acuerdo con el punto 135, donde la etapa de congelación (b) se lleva a cabo en un aparato con una temperatura de almacenamiento por debajo de -35 °C.

137. El método del punto 135 o 137, donde la etapa de secado primario (c) se lleva a cabo en un aparato con una temperatura de almacenamiento alrededor de -31 a -19 °C, o de alrededor de -31 a -21 °C.

30 138. Un método de preparación de una formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 131 en forma seca que comprende las siguientes etapas:

(a) proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que comprenda:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:

35 (i) serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado,

- (ii) serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado,
- (iii) serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, y
- (iv) serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado; y
- B. una composición de excipientes que comprende:

5

- a. trehalosa,
- b. poloxámero,
- c. urea,
- d. clorhidrato de arginina,
- e. trometamina, y

10

- f. seroalbúmina humana,

(b) congelar la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa en un aparato con una temperatura de almacenamiento por debajo de -35 °C para formar una formulación de vacuna contra el dengue congelada,

15

(c) someter la formulación de vacuna contra el dengue congelada a una etapa de secado primario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de -31 a -19 °C, o alrededor de -31 a -21 °C y a una presión por debajo de 0.1 mbar para formar un producto secado primario, y

20

(d) someter el producto secado primario a una etapa de secado secundario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de al menos 15 °C , o al menos 20 °C y a una presión por debajo de 1 mbar para formar un producto secado secundario.

139. El método de acuerdo con el punto 138, donde la etapa de congelación (b) se lleva a cabo en un aparato con una temperatura de almacenamiento por debajo de -40 °C, preferiblemente alrededor de -40 a -50 °C, tal como alrededor de -45 °C.

25

140. El método de cualquiera de los puntos 135 a 139, donde la etapa de secado primario (c) se lleva a cabo en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de -31 a -21 °C, preferiblemente alrededor de -29 a -25 °C, tal como alrededor de -27 °C.

141. El método de cualquiera de los puntos 135 a 140, donde la etapa de secado primario (c) se lleva a cabo a una presión de menos de 0.05 mbar, preferiblemente de alrededor de 0.01 a menos de 0.05 mbar, o de alrededor de 0.04 mbar.

30

142. El método de cualquiera de los puntos 135 a 141, donde el producto secado primario tiene un contenido de humedad residual de alrededor de 5 a 10 % p/p, o menos de 10 % p/p.

35

143. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 135 a 142, donde la etapa de secado secundario (d) se lleva a cabo en un aparato con una temperatura de almacenamiento de al menos 15 °C, o al menos 20 °C, o de alrededor de 15 a 40 °C, o de alrededor de 20 a 40 °C, o alrededor de 25 °C.

144. El método de cualquiera de los puntos 135 a 143, donde la etapa de secado secundario (d) se lleva a cabo a una presión de menos de 0.5 mbar, preferiblemente de alrededor de 0.1 a menos de 0.4 mbar, o de alrededor de 0.3 mbar, más preferiblemente a una presión de menos de 0.05 mbar.

5 145. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 135 a 144, donde el producto secado secundario tiene un contenido de humedad residual de alrededor de 0.01 a 2 % p/p, preferiblemente menos de 2 % p/p, más preferiblemente menos de 1 % p/p.

10 146. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 135 a 145, donde la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa se somete a la etapa de congelación b) en recipientes, tales como viales, cada uno de los cuales comprende una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue.

15 147. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 135 a 146, donde la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa se somete a la etapa de congelación b) en recipientes, tales como viales, cada uno de los cuales comprende múltiples dosis unitarias, por ejemplo, cinco dosis unitarias, de la formulación de vacuna contra el dengue.

148. El método de cualquiera de los puntos 135 a 147, donde la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa comprende:

alrededor de 9 a 11 % p/v, tal como alrededor de 10 % p/v de trehalosa,
alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v, tal como alrededor de 0.3 % p/v de poloxámero,
20 alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v, tal como alrededor de 0.3 % p/v de urea,
alrededor de 0.2 a 0.3 % p/v, tal como alrededor de 0.25 % p/v de clorhidrato de arginina,
alrededor de 0.05 a 0.15 % p/v, tal como alrededor de 0.1 % p/v de trometamina, y
alrededor de 0.05 a 0.15 % p/v, tal como alrededor de 0.1 % p/v de seroalbúmina humana.

25 149. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 135 a 148, donde la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa se somete a la etapa de congelación b) en un volumen que es menor, preferiblemente alrededor de la mitad, que el volumen usado para reconstituir la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada.

30 150. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 135 a 149, donde la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa se somete a la etapa de congelación b) en recipientes, tales como viales, cada uno de los cuales comprende una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en un volumen, que es alrededor de la mitad del volumen utilizado para reconstituir la dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada.

35 151. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 135 a 149, donde la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa se somete a la etapa de congelación b) en recipientes, tales como viales, cada uno de los cuales comprende cinco dosis unitarias de la formulación de

vacuna contra el dengue en un volumen, que es alrededor de la mitad del volumen utilizado para reconstituir cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue liofilizada.

152. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 135 a 151, donde la etapa de secado primario (c) se lleva a cabo durante un período de alrededor de 20 a 120 horas, preferiblemente alrededor de 30 a 100 horas, más preferiblemente alrededor de 40 a 70 horas, o alrededor de 50 a 70 horas.

153. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 135 a 152, donde la etapa de secado secundario (d) se lleva a cabo durante un período de alrededor de 1 a 15 horas, preferiblemente alrededor de 3 a 10 horas, más preferiblemente alrededor de 6 a 10 horas, o alrededor de 7 a 9 horas.

154. El método de acuerdo con cualquiera de los puntos 135 a 153, donde la etapa de secado primario y secundario se lleva a cabo durante un período de menos de 160 horas, preferiblemente alrededor de 50 a 120 horas, más preferiblemente alrededor de 50 a menos de 100 horas, o alrededor de 60 a 90 horas.

155. Una formulación de vacuna contra el dengue que comprende:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:

- (i) serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado,
- (ii) serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado,
- (iii) serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, y
- (iv) serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado; y

B. una composición de excipientes que comprende:

- a. trehalosa,
- b. poloxámero,
- c. urea,
- d. clorhidrato de arginina,
- e. trometamina, y
- f. seroalbúmina humana;

donde la relación de la cantidad de clorhidrato de arginina con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 4:1;

donde las sales de cloruro están contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 4.0 % p/p en función del peso seco de la formulación de vacuna;

donde las sales de fosfato están contenidas en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de menos de 1.0 % p/p en función del peso seco de la formulación de vacuna.

156. Una formulación de vacuna contra el dengue que comprende:

- 5 A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:
- (i) el serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado,
 - (ii) el serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado,
 - (iii) el serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, y
 - (iv) el serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado; y
- B. una composición de excipientes que comprende:
- a. trehalosa,
 - b. poloxámero,
 - c. urea,
 - 10 d. clorhidrato de arginina,
 - e. trometamina, y
 - f. seroalbúmina humana;
- 15 donde el serotipo 1 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/1 de dengue, el serotipo 2 de dengue es una cepa no quimérica de serotipo 2 de dengue, el serotipo 3 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/3 de dengue y el serotipo 4 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/4 de dengue;
- 20 donde la cepa de serotipo 2 de dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 PDK-53 vivo atenuado y las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 de dengue al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 de dengue con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos del dengue, lo que da como resultado las cuatro cepas de virus de dengue vivo atenuado TDV-1, TDV-2, TDV-3 y TDV-4.
157. Una formulación de vacuna contra el dengue que comprende:
- 25 A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:
- (i) TDV-1,
 - (ii) TDV-2,
 - (iii) TDV-3, y
 - (iv) TDV-4; y
- B. una composición de excipientes que comprende:
- a. trehalosa,
 - 30 b. poloxámero,
 - c. urea,
 - d. clorhidrato de arginina,
 - e. trometamina, y
 - f. seroalbúmina humana.
- 35 158. Una formulación de vacuna contra el dengue que comprende:

- 5 A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:
- (i) serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., TDV-1),
 - (ii) serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., TDV-2),
 - (iii) serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., TDV-3), y
 - (iv) serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado (p. ej., TDV-4); y
- B. una composición de excipientes que comprende, en función del peso seco de la formulación de vacuna:
- a. alrededor de 65 a 95 % p/p de trehalosa, tal como alrededor de 87.0 % p/p de trehalosa,
 - b. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de poloxámero, tal como alrededor de 2.9 % p/p de poloxámero,
 - 10 c. alrededor de 0.1 a 6.0 % p/p de urea, tal como alrededor de 2.9 % p/p de urea,
 - d. alrededor de 0.1 a 5.0 % p/p de clorhidrato de arginina, tal como alrededor de 2.4 % p/p de clorhidrato de arginina,
 - e. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de trometamina, tal como alrededor de 1.2 % p/p de trometamina,
 - y
 - 15 f. alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p de seroalbúmina humana, tal como alrededor de 0.96 % p/p de seroalbúmina humana.
159. Una formulación de vacuna contra el dengue que comprende:
- A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:
- (i) serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado,
 - 20 (ii) serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado,
 - (iii) serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, y
 - (iv) serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado; y
- B. una composición de excipientes que comprende:
- a. trehalosa,
 - 25 b. poloxámero,
 - c. urea,
 - d. clorhidrato de arginina,
 - e. trometamina, y
 - f. seroalbúmina humana;
- 30 donde el serotipo 1 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/1 de dengue, el serotipo 2 de dengue es una cepa no quimérica de serotipo 2 de dengue, el serotipo 3 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/3 de dengue y el serotipo 4 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/4 de dengue;
- 35 donde la cepa de serotipo 2 del dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 16681 en estado natural y difiere en al menos tres nucleótidos con respecto a la versión en estado natural tal como se

detallará a continuación:

- a) región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57)
- b) NS1-53 Gly a Asp (nt-2579)
- c) NS3-250 Glu a Val (nt-5270);

5 donde las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos de dengue, lo que da como resultado las siguientes cepas quiméricas de dengue:

- una quimera de DENV-2/1,
- 10 - una quimera de DENV-2/3, y
- una quimera de DENV-2/4.

160. Una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada que comprende:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende cuatro serotipos de virus del dengue vivos atenuados:

- 15 (i) una cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico,
- (ii) una cepa de serotipo 2 de dengue,
- (iii) una cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico, y
- (iv) una cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico;

20 donde la cepa de serotipo 2 del dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 16681 en estado natural y difiere en al menos tres nucleótidos con respecto a la versión en estado natural tal como se detallará a continuación:

- a) región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57)
- b) NS1-53 Gly a Asp (nt-2579)
- c) NS3-250 Glu a Val (nt-5270);

25 donde las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos de dengue, lo que da como resultado las siguientes cepas quiméricas de dengue:

- una quimera de DENV-2/1,
- 30 - una quimera de DENV-2/3, y
- una quimera de DENV-2/4;

y

B. una composición de excipientes que comprende:

- a. trehalosa,
- 35 b. poloxámero,

- c. urea,
- d. clorhidrato de arginina,
- e. trometamina, y
- f. seroalbúmina humana;

5 donde la seroalbúmina humana está contenida en la formulación de vacuna contra el dengue en una cantidad de alrededor de 0.1 a 1.0 % p/p en función del peso seco de la formulación de vacuna, donde la relación de la cantidad de clorhidrato de arginina con respecto a la cantidad de seroalbúmina humana contenida en la formulación de vacuna contra el dengue es de alrededor de 1:1 a 4:1.

10 161. Una formulación de vacuna contra el dengue que comprende:

A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:

- (i) serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado,
- (ii) serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado,
- (iii) serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, y
- (iv) serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado; y

15 B. una composición de excipientes que comprende, en función del peso seco de la formulación de vacuna:

- a. alrededor de 65 a 95 % p/p de trehalosa,
- b. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de poloxámero,
- 20 c. alrededor de 0.1 a 6.0 % p/p de urea,
- d. alrededor de 0.1 a 5.0 % p/p de clorhidrato de arginina,
- e. alrededor de 0.05 a 5.0 % p/p de trometamina,
- f. alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p de seroalbúmina humana
- g. alrededor de 0.05 a 3.0 % p/p de sales de cloruro, y
- 25 h. alrededor de 0.05 a 0.5 % p/p de sales de fosfato;

donde el serotipo 1 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/1 de dengue, el serotipo 2 de dengue es una cepa no quimérica de serotipo 2 de dengue, el serotipo 3 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/3 de dengue y el serotipo 4 de dengue es una cepa quimérica de serotipo 2/4 de dengue;

30 donde la cepa de serotipo 2 del dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 16681 en estado natural y difiere en al menos tres nucleótidos con respecto a la versión en estado natural tal como se detallará a continuación:

- a) región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57)
- b) NS1-53 Gly a Asp (nt-2579)
- 35 c) NS3-250 Glu a Val (nt-5270);

donde las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos de dengue, lo que da como resultado las siguientes cepas quiméricas de dengue:

- 5 - una quimera de DENV-2/1,
- una quimera de DENV-2/3, y
- una quimera de DENV-2/4.

162. Una formulación de vacuna contra el dengue liofilizada que comprende:

- 10 A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende cuatro serotipos de virus del dengue vivos atenuados:
 - (i) una cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico,
 - (ii) una cepa de serotipo 2 de dengue,
 - (iii) una cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico, y
 - (iv) una cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico;

15 donde la cepa de serotipo 2 del dengue deriva de la cepa del virus DEN-2 16681 en estado natural y difiere en al menos tres nucleótidos con respecto a la versión en estado natural tal como se detallará a continuación:

- a) región 5'-no codificante (NCR)-57 (nt-57)
- b) NS1-53 Gly a Asp (nt-2579)
- 20 c) NS3-250 Glu a Val (nt-5270);

donde las tres cepas quiméricas de dengue derivan de la cepa de serotipo 2 al reemplazar las proteínas estructurales prM y E de la cepa de serotipo 2 con las proteínas estructurales correspondientes de los otros serotipos de dengue, lo que da como resultado las siguientes cepas quiméricas de dengue:

- 25 - una quimera de DENV-2/1,
- una quimera de DENV-2/3, y
- una quimera de DENV-2/4;

y

B. una composición de excipientes que comprende:

- 30 a. trehalosa,
- b. poloxámero,
- c. urea,
- d. clorhidrato de arginina,
- e. trometamina, y
- 35 f. seroalbúmina humana;

donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue tras la reconstitución con 0.5 mL de un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable, o tras la reconstitución con un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL, comprende:

- 5 (i) la cepa de serotipo 2/1 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos 3.3 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (ii) la cepa de serotipo 2 de dengue en una concentración de al menos 2.7 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (iii) la cepa de serotipo 2/3 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos 4.0 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- 10 (iv) la cepa de serotipo 2/4 de dengue de carácter quimérico en una concentración de al menos 4.5 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- a. la trehalosa en una concentración de 40 a 80 g/L, tal como alrededor de 55 g/L o alrededor de 43 g/L,
- b. el poloxámero en una concentración de alrededor de 0.1 a 5.0 g/L, tal como alrededor de 1.65 g/L o alrededor de 1.42 g/L,
- 15 c. la urea en una concentración de alrededor de 0.1 a 6.0 g/L, tal como alrededor de 1.65 g/L o alrededor de 1.42 g/L,
- d. el clorhidrato de arginina en una concentración de alrededor de 0.5 a 5.0 g/L, tal como alrededor de 1.4 g/L o alrededor de 1.18 g/L,
- e. la trometamina en una concentración de alrededor de 0.1 a 1.5 g/L, tal como alrededor de 0.7 g/L o alrededor de 0.6 g/L, y
- 20 f. la seroalbúmina humana en una concentración de 0.1 a menos de 1 g/L, tal como alrededor de 0.55 g/L o alrededor de 0.48 g/L.

163. Un método de preparación de cinco dosis unitarias de una formulación de vacuna contra el dengue en forma seca que comprende las siguientes etapas:

- 25 (a) proporcionar una formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa que comprenda:
 - A. una composición de virus del dengue tetravalente que comprende:
 - (i) un serotipo 1 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2/1 del dengue de carácter quimérico,
 - (ii) un serotipo 2 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2 del dengue,
 - 30 (iii) un serotipo 3 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2/3 del dengue de carácter quimérico, y
 - (iv) un serotipo 4 del virus del dengue vivo atenuado, tal como una cepa de serotipo 2/4 del dengue de carácter quimérico; y
 - B. una composición de excipientes que comprende:
 - 35 a. alrededor de 9 a 11 % p/v, tal como alrededor de 10 % p/v de trehalosa,

- b. alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v, tal como alrededor de 0.3 % p/v de poloxámero,
- c. alrededor de 0.2 a 0.4 % p/v, tal como alrededor de 0.3 % p/v de urea,
- d. alrededor de 0.2 a 0.3 % p/v, tal como alrededor de 0.25 % p/v de clorhidrato de arginina,
- e. alrededor de 0.05 a 0.15 % p/v, tal como alrededor de 0.1 % p/v de trometamina, y
- 5 f. alrededor de 0.05 a 0.15 % p/v, tal como alrededor de 0.1 % p/v de seroalbúmina humana,
- (b) congelar la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de -40 a -50 °C para formar una formulación de vacuna contra el dengue congelada,
- (c) someter la formulación de vacuna contra el dengue congelada a una etapa de secado
- 10 primario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de -31 a -19 °C, o de alrededor de -31 a -21 °C y a una presión por debajo de 0.1 mbar durante un período de alrededor de 30 a 100 horas para formar un producto secado primario, y
- (d) someter el producto secado primario a una etapa de secado secundario en un aparato con una temperatura de almacenamiento de alrededor de 15 a 40 °C, o alrededor de 20 a 40 °C y a una
- 15 presión por debajo de 1 mbar durante un período de alrededor de 3 a 10 horas para formar un producto secado secundario,
- donde la formulación de vacuna contra el dengue en forma acuosa se somete a la etapa de congelación b) en un volumen que es alrededor de la mitad del volumen utilizado para reconstituir las cinco dosis unitarias de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca.
- 20 164. La formulación de vacuna contra el dengue de acuerdo con cualquiera de los puntos 1 a 92, donde una dosis unitaria de la formulación de vacuna contra el dengue en forma seca tras la reconstitución un diluyente acuoso farmacéuticamente aceptable hasta un volumen de 0.5 mL tiene un pH de alrededor de 7.0 a 8.5 y comprende:
- (i) el virus del dengue serotipo 1 en una concentración de al menos 3.3 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- 25 (ii) el serotipo 2 del virus del dengue en una concentración de al menos 2.7 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (iii) el serotipo 3 del virus del dengue en una concentración de al menos 4.0 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- (iv) el virus del dengue serotipo 4 en una concentración de al menos 4.5 log₁₀ ufp/0.5 mL,
- a. trehalosa en una cantidad de alrededor de 20 a 34 mg/0.5 mL,
- b. poloxámero en una cantidad de alrededor de 0.1 a 3.0 mg/0.5 mL,
- 30 c. urea en una cantidad de alrededor de 0.1 a 3.0 mg/0.5 mL,
- d. clorhidrato de arginina en una cantidad de alrededor de 0.1 a 2.0 mg/0.5 mL,
- e. trometamina en una cantidad de alrededor de 0.05 a 1.0 mg/0.5 mL,
- f. seroalbúmina humana en una cantidad de alrededor de 0.05 a 0.5 mg/0.5 mL,,
- g. sales de cloruro en una cantidad de menos de 2.0 mg/0.5 mL, y
- 35 h. sales de fosfato en una cantidad de menos de 0.3 mg/0.5 mL.